

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

*Přírodovědecká fakulta*

---

Studijní program: Biochemie



**Bc. Anežka Tichá**

NOVÉ ANALOGY PEPTIDU UVOLŇUJÍCÍHO PROLAKTIN S PRODLOUŽENÝM ÚČINKEM NA  
PŘÍJEM POTRAVY

New analogues of prolactin-releasing peptide with prolonged effect on food intake

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Praha 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lenky Maletínské, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze.....

.....

Podpis

## PODĚKOVÁNÍ

---

Na začátku své práce bych nejprve ráda poděkovala RNDr. Lence Maletínské, CSc. (Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, Praha, v.v.i.) za odborné vedení v průběhu celé práce, za konzultace a pomoc při psaní mé diplomové práce. Také bych ráda poděkovala své vedoucí práce, doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. (Katedra biochemie, PŘF UK).

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Veronice Nagelové za pomoc při experimentální činnosti, Ing. Miroslavě Blechové za syntézu peptidů, doc. RNDr. Tomáši Elbertovi, CSc. Za jodaci peptidů a celému kolektivu skupiny Antiobezitní peptidy za pomoc při práci a milé pracovní prostředí.

Velký dík patří také mé rodině za umožnění studia a také za jejich neustálou podporu při něm.

Tento projekt byl podpořen grantem AV ČR RVO:61388963 a grantem GAČR P303/10/1368

## ABSTRAKT

---

Peptid uvolňující prolaktin (PrRP) patří k tzv. RF-amidovým peptidům, pro které je typická C-koncová sekvence –Arg-Phe-NH<sub>2</sub>. Díky vzájemné podobnosti mají tyto peptidy obdobné biologické účinky. PrRP byl objeven při hledání endogenního ligandu k sirotčímu receptoru GPR10, když byl hledán faktor zodpovědný za sekreci prolaktinu. Tento účinek byl brzy zpochybněn a v současnosti je PrRP považován především za anorexigenní peptid. To dosvědčuje i fakt, že se u myší s vyřazeným genem pro PrRP nebo GPR10 vyskytuje hyperfagie a obezita. Kromě GPR10 se PrRP váže s vysokou afinitou i k receptoru NPFF<sub>2</sub>, jehož endogenním ligandem je rovněž anorexigenní neuropeptid FF (NPFF).

V této práci byl zkoumán vliv navázání různě dlouhých mastných kyselin na N-konec na biologickou aktivitu PrRP, a to *in vitro* ve vazebných experimentech a spouštění signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 v závislosti na koncentraci peptidu. V *in vivo* experimentech testujících vliv periferně podaných analogů na příjem potravy byl testován potenciální anorexigenní účinek lipidovaných analogů PrRP, který je centrální, a proto předpokládá přestup analogu PrRP přes hematoencefalickou bariéru.

Vazebnými testy bylo zjištěno, že všechny analogy se vážou k potkaní hypofyzární buněčné linii RC-4B/C s velkou afinitou, analogy s navázanou mastnou kyselinou dokonce s  $K_i$  o řád nižší než nativní PrRP. Vysoká afinita byla potvrzena také pro vazbu k buňkám s transfekovaným GPR10 i k buněčným membránám s transfekovaným receptorem NPFF<sub>2</sub>. Dále bylo zjištěno, že testované analogy spouští signalizační dráhu MAPK/ERK1/2 s  $EC_{50}$  v řádu 10<sup>-9</sup> M.

*In vivo* experimenty potvrdily, že po periferním podání nemá nativní PrRP vliv na příjem potravy, oproti tomu všechny analogy obsahující 14 nebo více uhlíků dlouhou mastnou kyselinou výrazně snižovaly příjem potravy, což napovídá, že zvýšení lipofilního charakteru látek zřejmě umožnilo jejich přestup přes hematoencefalickou bariéru, který je podmínkou jejich centrálního anorexigenního účinku. U testovaných peptidů nebyl zjištěn ani sedativní, ani analgetický efekt. Analogy palm-PrRP31 a myr-PrRP20 jsou tedy vhodné k dalšímu studiu a jako potenciální antiobezitika.

### KLÍČOVÁ SLOVA:

Peptid uvolňující prolaktin, lipidizace, vazba, GPR10, příjem potravy

## ABSTRACT

---

Prolactin-releasing peptide (PrRP) is a member of the family of RF-amide peptides. These peptides have typical C-terminal sequence –Arg-Phe-NH<sub>2</sub> and similar biological effects. PrRP was discovered as an endogenous ligand of an orphan receptor GPR10 while searching for a factor responsible for a prolactin secretion. This effect was not later confirmed and nowadays, PrRP is mainly considered as an anorexigenic peptide. This is supported by a fact that PrRP and GPR10 deficient mice suffer from hyperphagia and late-onset obesity. Besides GPR10, PrRP is bound to NPFF<sub>2</sub> receptor whose endogenous ligand is neuropeptide FF (NPFF).

In this study, the PrRP's analogues modified at the N-terminus with fatty acids of different lengths were tested *in vitro* on binding and activation MAPK/ERK1/2 signalling pathway. In *in vivo* experiments on food intake, the central anorexigenic effects of lipidized PrRP-analogues were tested provided their crossing blood brain barrier.

Binding studies showed that all analogues bound to rat pituitary RC-4B/C cells with high affinity, analogues containing fatty acid with  $K_i$  of one order of magnitude lower than native PrRP. High affinity was also confirmed for binding to cells overexpressing GPR10 receptor and cell membranes with overexpressed NPFF<sub>2</sub> receptor. All tested analogues activated MAPK/ERK1/2 signalling cascade with  $EC_{50}$  in 10<sup>-9</sup> M range.

*In vivo* experiments confirmed that PrRP had no effect on food intake after peripheral administration. On the contrary, all analogues with 14-carbon fatty acid or longer attenuated food intake, probably because of a higher lipophilicity of the analogues that could facilitate transport over the blood-brain barrier. Tested analogues didn't shown any sedative or analgetic effect. In conclusion, analogues palm-PrRP31 a myr-PrRP20 are proposed as potential antiobesitic agents for further studies. (In Czech)

## KEY WORDS:

Prolactin-releasing peptide, lipidization, binding, GPR10, food intake

# OBSAH

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>                                      | <b>9</b>  |
| <b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>                                   | <b>13</b> |
| 1.1 OBEZITA.....   | 13        |
| 1.1.1 Obezita ve světě.....                                      | 13        |
| 1.1.2 Farmakoterapie obezity .....                               | 13        |
| 1.1.2.1 Orlistat .....   | 14        |
| 1.2 REGULACE PŘÍJMU POTRAVY.....                                 | 15        |
| 1.3 RF-amidové peptidy .....                                     | 17        |
| 1.3.1 RF-amidové peptidy .....                                   | 17        |
| 1.3.2 Receptory pro RF-amidové peptidy .....                     | 18        |
| 1.4 PEPTID UVOLŇUJÍCÍ PROLAKTIN .....                            | 18        |
| 1.4.1 Objev .....  | 18        |
| 1.4.2 Struktura .....  | 19        |
| 1.4.3 Výskyt PrRP v organismu .....                              | 19        |
| 1.4.4 Receptor pro PrRP.....                                     | 20        |
| 1.4.5 Funkce PrRP v organismu .....                              | 20        |
| 1.4.5.1 Vliv na vylučování hypofyzárních hormonů.....            | 21        |
| 1.4.5.1.1 Prolaktin (PRL).....                                   | 21        |
| 1.4.5.1.2 Oxytocin a vasopresin .....                            | 22        |
| 1.4.5.2 Působení PrRP v hypothalamo-hypofýzo-adrenální ose ..... | 22        |
| 1.4.5.3 Působení PrRP na vnímání bolestivých podnětů .....       | 23        |
| 1.4.5.4 Působení PrRP na regulaci příjmu potravy .....           | 23        |
| 1.4.6 Vztah mezi strukturou a aktivitou analogů PrRP .....       | 24        |
| 1.4.6.1 Lipidizace peptidů .....                                 | 24        |
| 1.5 ÚČINEK PrRP NA BUNĚČNOU LINII RC-4B/C .....                  | 25        |
| <b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>  | <b>27</b> |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>3</b> | <b>MATERIÁL A METODY .....</b>   | <b>28</b> |
| 3.1      | MATERIÁL.....  | 28        |
| 3.1.1    | Chemikálie.....  | 28        |
| 3.1.2    | Materiály.....   | 29        |
| 3.1.3    | Buněčné linie, buněčné membrány .....  | 29        |
| 3.1.4    | Přístroje.....   | 30        |
| 3.1.5    | Peptidy .....  | 30        |
| 3.1.5.1  | Jodace peptidů.....  | 31        |
| 3.2      | POKUSY IN VITRO.....   | 32        |
| 3.2.1    | Pěstování buněčných linií .....  | 32        |
| 3.2.2    | Vazebné experimenty .....  | 32        |
| 3.2.2.1  | Optimalizace podmínek vazebných experimentů .....  | 33        |
| 3.2.2.2  | Saturační vazebné experimenty na buňkách CHO-K1 s lidským receptorem GPR10.....                          | 34        |
| 3.2.2.3  | Kompetitivní vazebné experimenty na buňkách RC-4B/C a CHO-K1 s receptorem GPR10 .....                    | 34        |
| 3.2.2.4  | Kompetitivní vazebné experimenty na membránách s lidským receptorem NPFF <sub>2</sub> nebo Y5.....       | 34        |
| 3.2.3    | Spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2 do buněk CHO-K1 s receptorem GPR10 účinkem PrRP a jeho analogů..... | 36        |
| 3.2.3.1  | Sběr vzorků .....  | 36        |
| 3.2.3.2  | Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v SDS prostředí.....  | 36        |
| 3.2.3.3  | Přenos proteinů na membránu .....  | 36        |
| 3.2.3.4  | Imunochemická detekce proteinů na membráně .....   | 37        |
| 3.2.4    | Vyhodnocení <i>in vitro</i> experimentů .....  | 38        |
| 3.3      | POKUSY IN VIVO.....  | 39        |
| 3.3.1    | Experimentální zvířata .....   | 39        |
| 3.3.2    | Test příjmu potravy po podání analogů PrRP .....   | 39        |
| 3.3.3    | Zjištění sedativních účinků peptidů testem v otevřeném poli .....  | 40        |
| 3.3.4    | Zjištění analgetických účinků peptidů pomocí testu na horké plotně.....                                  | 40        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.3.5    | Statistické vyhodnocení experimentů <i>in vivo</i> .....  | 40        |
| <b>4</b> | <b>VÝSLEDKY .....</b>   | <b>41</b> |
| 4.1      | <i>POKUSY IN VITRO</i> .....  | 41        |
| 4.1.1    | Pěstování buněčných linií .....   | 41        |
| 4.1.2    | Vazebné experimenty .....   | 42        |
| 4.1.2.1  | Optimalizace podmínek vazebných experimentů na buňkách CHO-K1 s receptorem GPR10 .....                                | 42        |
| 4.1.2.2  | Interakce <sup>125</sup> I-hPrRP31 s receptorem GPR10 .....   | 43        |
| 4.1.2.3  | Vazba analogů PrRP k buňkám RC-4B/C .....   | 44        |
| 4.1.2.4  | Vazba analogů PrRP k lidskému receptoru GPR10 .....   | 46        |
| 4.1.2.5  | Vazba analogů PrRP k lidskému receptoru NPFF <sub>2</sub> .....   | 48        |
| 4.1.2.6  | Vazba analogu palm-PrRP31 k receptoru Y5 .....  | 50        |
| 4.1.2.7  | Shrnutí výsledků kompetitivních vazebných experimentů .....   | 51        |
| 4.1.3    | Spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2 po působení analogů PrRP u buněčné linie CHO-K1 s lidským receptorem GPR10 ..... | 53        |
| 4.2      | <i>POKUSY IN VIVO</i> .....   | 56        |
| 4.2.1    | Ovlivnění příjmu potravy po SC podání PrRP31 a jeho analogů .....   | 56        |
| 4.2.2    | Sedativní účinky analogů PrRP .....   | 60        |
| 4.2.3    | Analgetické účinky analogů PrRP .....   | 60        |
| <b>5</b> | <b>DISKUSE .....</b>  | <b>62</b> |
| 5.1      | <i>NOVÉ ANALOGY PrRP</i> .....  | 62        |
| 5.2      | <i>IN VITRO EXPERIMENTY</i> .....   | 63        |
| 5.3      | <i>IN VIVO EXPERIMENTY</i> .....  | 65        |
| <b>6</b> | <b>ZÁVĚR .....</b>  | <b>68</b> |
|          | <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>  | <b>69</b> |



## SEZNAM ZKRATEK

---

Ab – Protilátka (*Antibody*)

ACTH – Adrenokortikotropní hormon

AgRP – *Agouti-related peptid*

AP – *Area postrema*

ARC – *Nucleus arcuatus*

BMI – *Body Mass Index*

$B_{\max}$  – Celkový počet receptorů na buňce

$B_{\text{nsp}}$  – Nespecifická vazba

BPTI – Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*)

BSA – Hovězí sérový albumin (*Bovine Serum Albumin*)

$B_{\text{sp}}$  – Specifická vazba

BST – Lůžkové jádro striae terminalis (*Bed nucleus of stria terminalis*)

CART – Kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (*Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*)

CCK – Cholecystokinin

CHO-K1 – Buněčná linie z ovaríí čínského křečka

CNS – Centrální nervový systém

cpm – četnost za minutu (*counts per minute*)

CRH – Kortikoliberin

C57Bl/6 – Kmen myši

dec – Kyselina dekanová

dec-PrRP20 – Peptid uvolňující prolaktin (krátká forma) s navázanou kys. dekanovou

dec-PrRP31 – Peptid uvolňující prolaktin (dlouhá forma) s navázanou kys. dekanovou

dodec – Kyselina dodekanová

dodec-PrRP20 – Peptid uvolňující prolaktin (krátká forma) s navázanou kys. dodekanovou

dodec-PrRP31 – Peptid uvolňující prolaktin (dlouhá forma) s navázanou kys. dodekanovou

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMN – Dorsomediální jádro

EGF – Epidermální růstový faktor (*Epidermal growth factor*)

$EC_{50}$  – Poloviční efektivní koncentrace  
*farf 1-5* – Geny kódující RF-amidové peptidy  
 FBS – Fetální hovězí sérum (*Fetal bovine serum*)  
 FMRF-amid – První objevený RF-amidový peptid  
 GIP – Gastrointestinální inhibiční peptid  
 GLP-1 – Peptid podobný glukagonu (*Glucagon-like peptid 1*)  
 GPR10 – Receptor spojený s G proteinem (*G protein coupled receptor*), receptor pro PrRP  
 HEK – *Human Embryonal Kidney*  
 Hepes – N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonová kyselina)  
 hGR3 – Jiné označení receptoru GPR10  
 HPA – Hypothalamo-hypofýzo-adrenální osa (*Hypothalamo-pituitary-adrenal axis*)  
 hPrRP – Lidský homolog PrRP (*Human PrRP*)  
 HRP – Křenová peroxidasa (*Horseradish peroxidase*)  
 $IC_{50}$  – Poloviční inhibiční koncentrace  
 IgG – Imunoglobulin G  
 $K_d$  – Rovnovážná disociační konstanta radioligandu  
 $K_i$  – Inhibiční konstanta neznačeného ligandu  
 LHA – Laterální hypothalamická oblast  
 MAPK/ERK1/2 – Mitogenem aktivovaná proteinkinasa/extracelulárním signálem regulovaná proteinkinasa 1/2  
 ME – *Eminencia mediana*  
 mRNA – Mediátorová ribonukleová kyselina  
 myr – Kyselina myristová  
 myr-PrRP20 – Peptid uvolňující prolaktin (krátká forma) s navázanou kys. myristovou  
 myr-PrRP31 – Peptid uvolňující prolaktin (dlouhá forma) s navázanou kys. myristovou  
 NA – Noradrenalin  
 Nle - Norleucin  
 NPFF – Neuropeptid FF  
 NPFF<sub>2</sub> – Receptor pro neuropeptid FF typu 2  
 NPY – Neuropeptid Y  
 NTS – *Nucleus tractus solitarius*

oct – Kyselina octová  
oct-PrRP20 – Peptid uvolňující prolaktin (krátká forma) s navázanou kys. octovou  
oct-PrRP31 – Peptid uvolňující prolaktin (dlouhá forma) s navázanou kys. octovou  
palm – Kyselina palmitová  
palm-PrRP31 – Peptid uvolňující prolaktin s navázanou kyselinou palmitovou  
PBN – Parabrachiální jádro  
PBS – Fosfátový pufr (*Phosphate-buffered saline*)  
PEI – Polyethylenimin  
PerVN – Periventrikulární jádro  
PFA – Perifornikální oblast hypothalamu  
PL – Pankreatická lipasa (*Human pancreatic lipase*)  
POMC - Proopiomelanokortin  
PRL - Prolaktin  
PrRP – Peptid uvolňující prolaktin  
PrRP20 – Peptid uvolňující prolaktin, krátká forma  
PrRP31 – Peptid uvolňující prolaktin, dlouhá forma  
PVDF – Polyvinyliden difluorid  
PVN – Paraventrikulární jádro  
PYY – Peptid YY  
RC-4B/C – Buněčná linie izolovaná z potkaního adenohypofyzárního adenomu  
rPrRP – Krysí homolog PrRP (*Rat PrRP*)  
SC – Subkutánní podání  
SDS – Dodecylsulfát sodný  
S.E.M. – Střední chyba průměru  
SON – Supraoptické jádro (*Supraoptic nucleus*)  
stear – Kyselina stearová  
stear-PrRP31 – Peptid uvolňující prolaktin s navázanou kyselinou stearovou  
TBS – Promývací pufr (*Tris-Buffered Saline*)  
THL - Tetrahydrolipstatin  
TRH – Tyreoliberin  
Tris – Trizma base, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

UHR-1 – Potkaní receptor pro PrRP

VLRN – Ventrolaterální retikulární jádro

VMN – Ventromediální jádro

Y5 – Receptor pro neuropeptid Y typu 5

1DMe – Stabilní analog NPFF

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

---

## 1.1 OBEZITA

### 1.1.1 Obezita ve světě

V posledních letech vzrůstá celosvětově velice výrazně prevalence obezity. Od roku 1980 do roku 2008 se téměř zdvojnásobil počet obézních lidí, v roce 2008 trpělo více než 50 % mužů a žen nadváhou, z toho 23 % žen a 20 % mužů bylo obézních. Alarmující je také fakt, že jen v regionech sledovaných Světovou zdravotnickou organizací bylo v totéž roce více než 20 milionů obézních dětí mladších 5 let. V současnosti je obezita pátou nejčastější příčinou smrti [1].

Obezita často vede k nežádoucím vlivům na citlivost k insulinu, krevní tlak, hladinu cholesterolu a triglyceridů. S rostoucím BMI (*Body mass index*) roste proto i nebezpečí diabetu mellitu 2. typu, ischemické choroby srdeční a ischemické cévní mozkové příhody [2]. Je tedy pravděpodobné, že epidemie obezity bude v následujících letech výrazně ohrožovat lidské zdraví [3].

### 1.1.2 Farmakoterapie obezity

Léčba obezity farmaky většinou nevede k významnému snížení hmotnosti (<5 kg/rok) [4], navzdory tomu však přitahuje velkou pozornost jak klinických lékařů, tak jejich pacientů, především z důvodu zlepšení citlivosti k insulinu, kontroly glykemie, dyslipidemie a hypertenze u pacientů s nadváhou a obezitou [5]. Hlavním cílem redukce váhy je snížit riziko diabetu 2. typu a kardiovaskulárních onemocnění, tudíž se od farmak pro terapii obezity očekává absence negativních vlivů a v lepším případě pozitivní vliv na kardiovaskulární systém [6]. Mnoho účinných léčiv k terapii obezity muselo být staženo z trhu z důvodu špatného vlivu na kardiovaskulární systém (např. sibutramin, fenfluramin, rimonaband).

V současnosti jsou na českém trhu k dostání léčiva k farmakoterapii obezity pouze s jednou účinnou látkou, tou je orlistat [7].

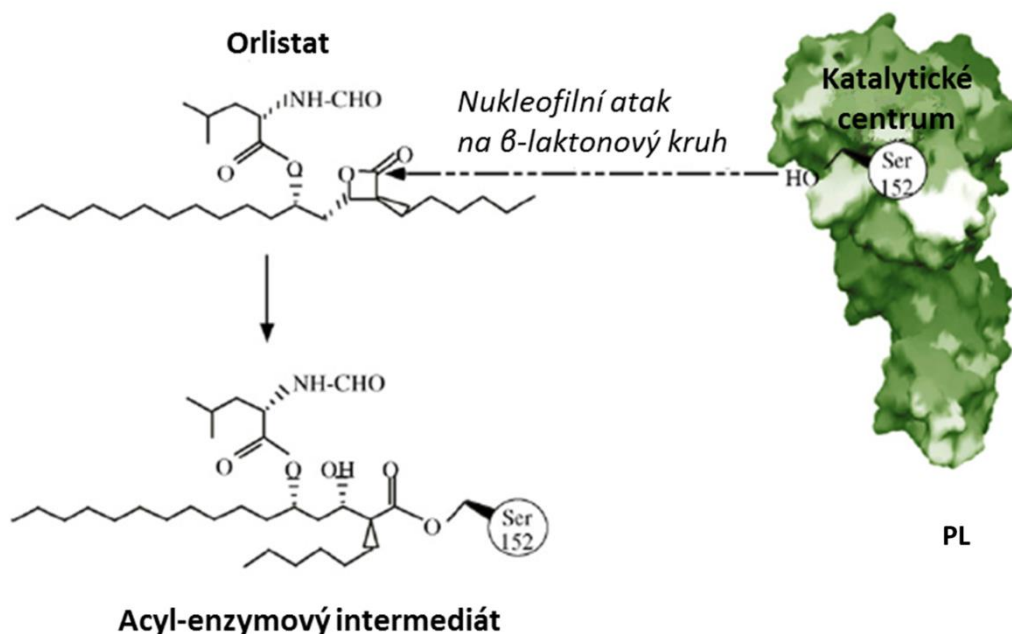
#### 1.1.2.1 Orlistat

Orlistat je reverzibilní inhibitor střevní lipasy. Způsobuje snížení rychlosti hydrolýzy tuků přijatých v potravě a zároveň snižuje jejich absorpci ze střeva až o 30 %, čímž snižuje kalorický příjem pacientů [8]. Z chemického hlediska se jedná o tetrahydrolipstatin (THL), hydrogenovaný analog lipstatinu izolovaného ze *Streptomyces toxytricini* [9].

Pankreatická lipasa (PL) obsahuje podobnou katalytickou třídu jako serinové proteasy. V takzvané uzavřené konformaci je aktivní centrum uschováno pod „klapkou“, která brání přístupu k substrátu. V otevřené konformaci odklon „klapky“ zpřístupní velký hydrofobní povrch enzymu a hydrofilní doména, která byla předtím přístupná na povrchu, je uschována uvnitř enzymu [10]. Možným mechanismem působení THL je tvorba stechiometrického kovalentního stabilního aduktu s HPL, tento mechanismus je znázorněn na obrázku (Obr. 1, str. 15).

Bylo také zjištěno, že kromě pankreatické lipasy inhibuje také thioesterasovou doménu synthasy mastných kyselin, která je spojována s progresí nádorů, mohl by tedy mít pozitivní účinky i v léčbě některých nádorových onemocnění [11].

Přes nesporné pozitivní působení má orlistat také vedlejší účinky, a to hlavně průjemy (obzvláště v kombinaci se stravou bohatou na tuky), nadýmání a dyspepsii z důvodu sníženého vstřebávání tuků ze střev, problémem může být také snížený příjem vitaminů, především těch rozpustných v tucích [6].



**Obr. 1 Schematická ilustrace vzniku kovalentního aduktu mezi aktivním místem pankreatické lipasy (Ser152) v jeho otevřené konformaci a  $\beta$ -laktonovým kruhem THL**

PL – lidská pankreatická lipasa, THL – tetrahydrolipstatin, orlistat

Upraveno podle [12]

## 1.2 REGULACE PŘÍJMU POTRAVY

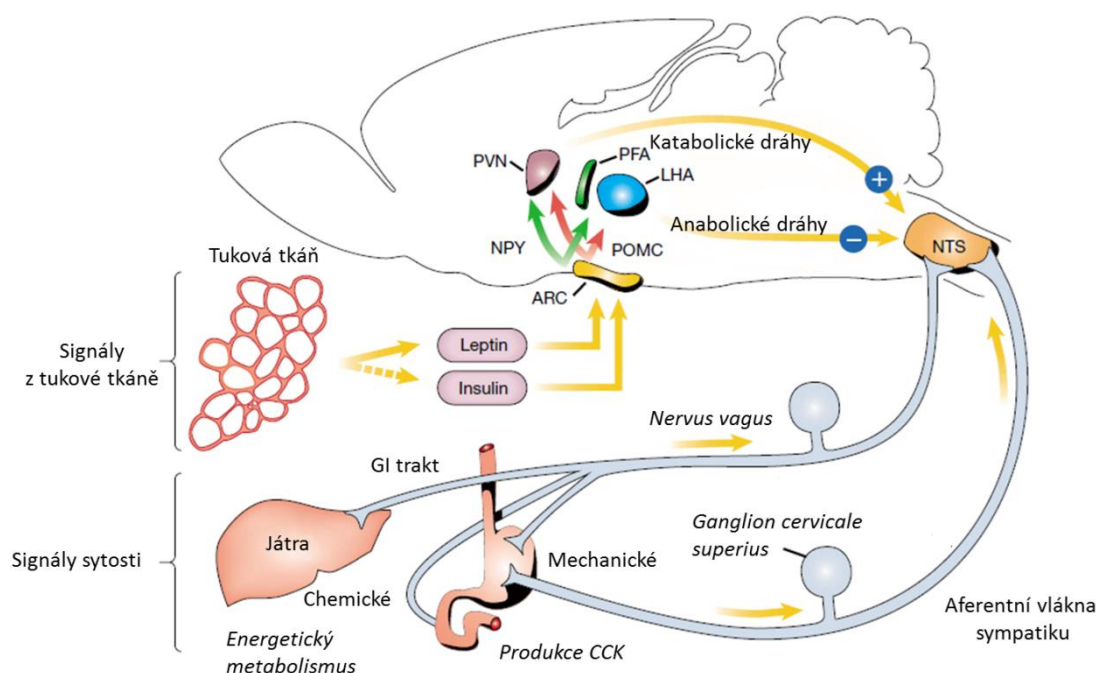
Regulace příjmu potravy je velice komplexní děj zahrnující vzájemnou integraci signálů jak z centrálního nervového systému (CNS), tak z periferie. V CNS existují specifické populace neuronů, které se účastní regulace příjmu potravy - rozhodování o příjmu a výdeji energie [13]. Na obrázku je znázorněn neuroanatomický model drah vzájemně spolupracujících na regulaci příjmu potravy (Obr. 2, str. 17). Centrem řízení regulace příjmu potravy je hypothalamus.

Jedním z důležitých center pro regulaci příjmu potravy je hypothalamické jádro *nucleus arcuatus* (ARC), sem přicházejí signály z periferie, které jsou odtud předávány dál do CNS. Těmito signály jsou hlavně insulin a leptin. Leptin je produkován výhradně tukovou tkání a jeho plazmatické koncentrace vzrůstají v závislosti na poměru tukové tkáně k tělesné hmotnosti. V ARC se váže k dlouhé formě svého receptoru, který je zde

vysoce exprimován [14]. V ARC se nachází dvě neurální populace regulující příjem potravy: jedna skupina neuronů produkujících orexigenní neuropeptidy, jakými jsou např. neuropeptid Y (NPY) a *agouti-related peptid* (AgRP), další skupinou jsou neurony exprimující anorexigenní peptidy, např. proopiomelanokortin (POMC) a kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (CART, *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*).

POMC/CART neurony jsou přímo pozitivně ovlivňovány leptinem a insulinem, NPY/AgRP neurony jsou přímo ovlivňovány ghrelinem a zároveň přes GABA-receptory tlumí POMC/CART neurony [15]. Tyto neurony směřují do paraventriculárního jádra (PVN) a laterální/perifornikální hypothalamické oblasti (LHA/PFA), kde navazují na centrální autonomní dráhy a pokračují do autonomních center v prodloužené míše, kde zprostředkují signály sytosti. Takovým centrem je především *nucleus tractus solitarius* (NTS). Sem jsou také přiváděny po nervu vagu signály sytosti z periferie, především z gastrointestinálního traktu, např. cholecystokinin (CCK). V NTS jsou všechny tyto signály zpracovány a vychází odtud (a z dalších mozkových center) neurální síť, která zprostředkovává signály vedoucí k ukončení jednotlivých jídel. Ta je aktivována katabolickými signály z PVN, naopak inhibována signály z LHA/PFA [16].





**Obr. 2 Neuroanatomický model drah interagujících na regulaci příjmu potravy**

PVN – paraventriculární jádro, NPY – neuropeptid Y, ARC – nucleus arcuatus, POMC – proopiomelanokortin, LHA – laterální hypothalamická oblast, PFA – perifornikální oblast hypothalamu, NTS – nucleus tractus solitarius, CCK – cholecystokinin

Upraveno podle [16]

### 1.3 RF-amidové peptidy

#### 1.3.1 RF-amidové peptidy

Jako RF-amidové peptidy jsou označovány neuropeptidy, jejichž charakteristickým znakem je zakončení C-konce peptidového řetězce sekvencí -Arg-Phe-NH<sub>2</sub>. Toto zakončení je velice důležité pro vazbu peptidů k jejich receptorům [17, 18]. Ve velkém počtu se vykytují u bezobratlých živočichů, např. *Caenorhabditis elegans* (22 genů, z těch vzniká 59 různých RF-amidových peptidů), avšak byly nalezeny i u obratlovců [19]. Podle prvního objeveného peptidu (FMRF-amid) bývají RF-amidové peptidy také někdy označovány jako rodina FaRP (*FMRFamid-related peptides*) [18].

Doposud bylo v savčím genomu identifikováno 5 genů kódujících prekurzorové RFamidové peptidy (*farp-1* až *farp-5*), ty mohou být štěpeny na kratší peptidy: neuropeptid FF (NPFF) a neuropeptid AF (z *farp-1*), peptid uvolňující prolaktin (PrRP; *farp-2*), neuropeptid SF a neuropeptid VF (*farp-3*), metastin (*farp-4*) a 26-RF-NH<sub>2</sub> (*farp-5*)

[18]. Dnes jsou RF-amidové peptidy považovány za velkou a různorodou rodinu peptidů zahrnující neuropeptidy, látky podobné hormonům a tumor supresorové peptidy [20].

RF-amidové peptidy mají široké spektrum biologických účinků, což je zapříčiněno variabilitou N-terminální sekvence [18, 20, 21]. Na buněčné úrovni se účastní regulace apoptózy [20], mají vliv např. na vnímání bolesti, sekreci různých hormonů, působí na kardiovaskulární systém apod. Jednou z významných funkcí těchto peptidů je vliv na příjem potravy a energetickou rovnováhu [18, 19].

### **1.3.2 Receptory pro RF-amidové peptidy**

Receptory pro RF-amidové peptidy patří mezi receptory spřažené s G-proteinem. Díky podobnosti C-konce peptidů, který je důležitý pro vazbu k receptorům, se může na receptor pro daný RF-amidový peptid vázat i několik dalších peptidů z rodiny RF-amidových peptidů. Bylo např. zjištěno, že k lidskému receptoru NPFF<sub>2</sub> se váže také PrRP a to s afinitou pouze o řád nižší než endogenní ligand NPFF [22, 23]. Oproti tomu receptor pro PrRP (GPR10) má zachovanou vysokou selektivitu, zatím jediným známým ligandem s významnou afinitou pro tento receptor je PrRP [24].

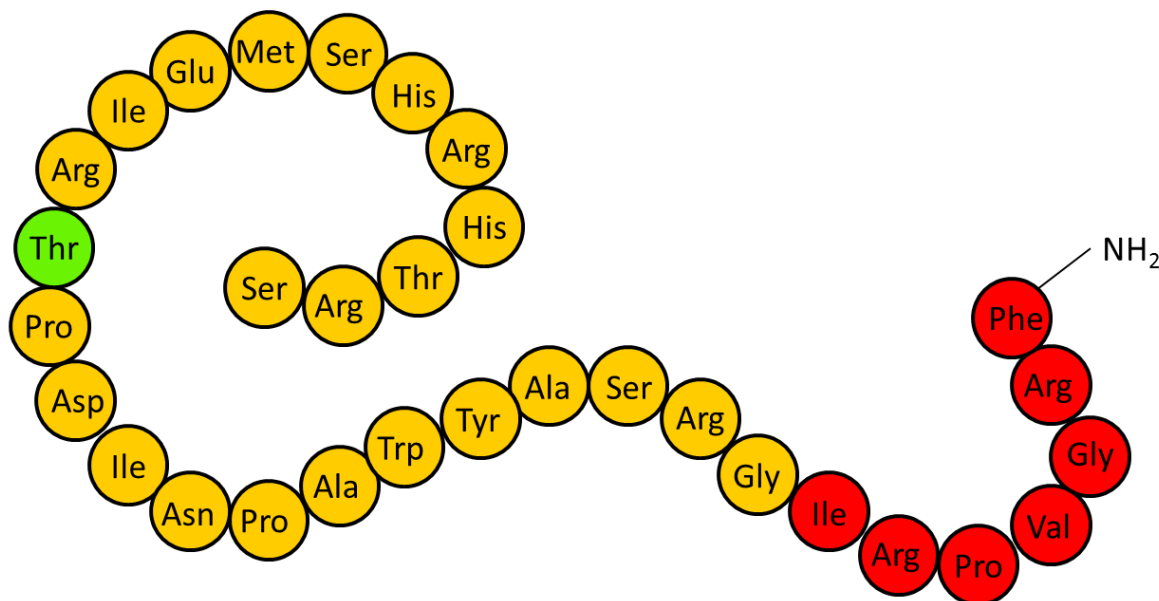
## **1.4 PEPTID UVOLŇUJÍCÍ PROLAKTIN**

### **1.4.1 Objev**

Peptid uvolňující prolaktin (*Prolactin-Releasing Peptide*, PrRP) byl objeven v roce 1998 při hledání endogenního ligandu k sirotčímu receptoru GPR10 (receptoru, pro který není znám žádný ligand), kdy byl hledán faktor ovlivňující vylučování prolaktinu. K izolaci a identifikaci tohoto peptidu z extraktu z hovězího hypothalamu byla použita tzv. metoda obrácené farmakologie – metoda kombinující chromatografickou frakcionaci a funkční esej (v tomto případě uvolňování kyseliny arachidonové, o které se v té době předpokládalo, že zprostředkovává sekreci prolaktinu [25]) [26].

### 1.4.2 Struktura

Bylo zjištěno, že se PrRP v organismu nachází ve dvou isoformách nazvaných PrRP31 a PrRP20, které vznikají z jednoho prepropeptidu [26]. Přestože se délka prepropeptidu u různých živočišných druhů liší (98 aminokyselin u skotu, 87 u člověka, 83 u potkanů a 82 u myší), jeho sekvence je téměř identická, což naznačuje, že PrRP hraje v organismu důležitou úlohu [17], avšak jeho fyziologická funkce nemusí být u všech živočišných druhů stejná [19]. Primární struktura PrRP je znázorněna na obrázku (Obr. 3).



**Obr. 3 Primární struktura lidského PrRP31**

*Zeleně je označen threonin, který je N-koncovou aminokyselinou PrRP20, červeně jsou označeny aminokyseliny nezbytné pro biologickou funkci PrRP.*

Prepropeptid obsahuje dvě štěpící místa, proto z něj následnými úpravami vznikají 2 různě velké peptidy, a to peptid s 31 aminokyselinami (PrRP(1-31); PrRP31) a peptid složený z 20 aminokyselin (PrRP(12-31); PrRP20) [26].

### 1.4.3 Výskyt PrRP v organismu

Nejvíce mRNA pro PrRP je produkováno v NTS (asi 70 % celkového množství) [27], oproti tomu nejvyšší koncentrace samotného PrRP byla zjištěna v hypothalamu [28]. Mimo CNS se PrRP nachází v nižších koncentracích [29], v krevní plasmě, dření nadledvin

[30], slinivce břišní, varlatech, nadvarlatech, placentě [29] a v tenkém i tlustém střevě [31].

Nebyl zjištěn rozdíl v počtu neuronů produkujících PrRP mezi samci a samicemi [32], ani mezidruhové rozdíly ve výskytu PrRP [31]. Po podání gonadálních hormonů estradiolu nebo progesteronu dochází u samic ke zvýšení transkripce mRNA pro PrRP, vyšší hladina této mRNA je také u samic v proestru, kdy je také vylučováno vyšší množství estrogenů [27, 33].

#### **1.4.4 Receptor pro PrRP**

Receptor pro PrRP (GPR10, jiné označení také hGR3 – lidský receptor, nebo také UHR-1 vyskytující se u potkanů) byl objeven v roce 1995, skládá se z 369 aminokyselin a patří do rozsáhlé rodiny receptorů spřažených s G-proteinem, které vykazují podobné strukturní vlastnosti jako např. 7 hydrofobních transmembránových úseků [34]. Svou strukturou je nejbližší receptoru pro neuropeptid Y (homologie z 31 % celkově a 46 % v transmembránových oblastech), přesto NPY neaktivuje receptor GPR10 [34]. Je možné, že se tyto receptory vyvinuly z jednoho původního receptoru [35].

V organismu se GPR10 nachází jak v CNS, tak v periferních tkáních. Oproti PrRP se GPR10 nachází v CNS na více místech, neurony s GPR10 byly objeveny v hypothalamu v paraventriculárním jádru (PVN), periventriculárním jádru (PerVN), dorsomediálním jádru (DMN) a ventromediálním jádru (VMN), dále v předním laloku hypofýzy, v amygdale, v mozkovém kmeni v *area postrema* (AP), v *nucleus tractus solitarius* (NTS), ve ventrolaterálním retikulárním jádru (VLRN), v parabrachiálním jádru (PBN) a v lůžkovém jádru striae terminalis (BST, *bed nucleus of stria terminalis*) [26, 36-39]. V periferních tkáních byla naopak mRNA pro receptor GPR10 objevena pouze v dřeni nadledvin [30, 40]. U samic se vyskytuje vyšší počet receptorů než u samců [41].

#### **1.4.5 Funkce PrRP v organismu**

PrRP se účastní regulace mnoha fyziologických procesů v organismu. Nejprve bylo zjištěno, že jeho působením dochází ke zvýšení sekrece prolaktinu [26], avšak další studie zjistily, že podání PrRP potkaním samcům neovlivňuje vylučování prolaktinu, což nabízí domněnku, že uvolňování prolaktinu není hlavní funkcí tohoto peptidu [41].

Se zjištěním, že se PrRP nachází v hypothalamických jádrech účastnících se regulace energetické rovnováhy (PVN, DMN), začala být studována možnost, jestli PrRP nepůsobí také jako faktor ovlivňující příjem potravy [42]. Stejně tak výskyt PrRP i jeho receptoru v dalších částech mozku (např. hypothalamus, NTS) naznačuje zapojení v regulaci odpovědi na bolestivé podněty, stres a další funkce organismu [29].

#### **1.4.5.1 Vliv na vylučování hypofyzárních hormonů**

##### **1.4.5.1.1 Prolaktin (PRL)**

Prvotní studie, které se snažily objasnit fyziologické účinky PrRP, vycházely ze zjištění, že GPR10 je vysoce exprimován v adenohypofýze, proto byly zaměřeny na jeho možnou hypofyzotropní funkci [26, 43]. Předběžné *in vitro* testy, podle kterých byl peptid pojmenován, popisovaly vliv PrRP na sekreci prolaktinu z buněk hypofyzární tumorové linie [26]. Následné studie *in vivo* zjišťující důležitost PrRP jako centrálního mediátoru uvolňování prolaktinu však podaly kontroverzní výsledky s pozitivním účinkem u samců pouze ve vysokých dávkách (500 nmol/kg) intravenózně podaného PrRP, u samic stačila dávka nižší, s rozdílným vlivem při podání samicím v různých částech pohlavního cyklu [44]. Poté bylo také zjištěno, že po centrálním podání PrRP nedochází k žádné sekreci prolaktinu [45, 46]. Navíc při imunohistochemických experimentech nebyla potvrzena přítomnost PrRP v *eminencia mediana* (část hypothalamu, kde se shromažďují všechny hypothalamické liberiny a statiny před vstupem do hypofyzárního portálního systému) [47, 48]. Je možné, že PrRP působí na adenohypofýzu buď jako hormon vylučovaný z periferních tkání (nadledviny, pankreas, varlata, placenta), nebo nepřímým centrálním mechanismem přes hypofyzární neurony [49], což je pravděpodobnější, jelikož centrální podání PrRP ovlivňuje mnoho adenohypofyzárních hormonů [46].

V současnosti je za hlavní faktor, jehož působením dochází k sekreci PRL, považován tyreoliberin (TRH) [25]. Jelikož nejvyšší účinnost vzhledem k vylučování PRL byla dosažena po podání PrRP společně právě s TRH, je možné, že PrRP pouze zvyšuje účinky TRH [50].

Zajímavé je, že u ryb a obojživelníků vedou PrRP vlákna k buňkám produkujícím prolaktin, systémové podání rybího homologu PrRP pstruhovi duhovému vedlo k sekreci PRL a somatolaktinu [51]. Je proto možné, že PrRP představuje starý faktor pro přímou regulaci sekrece prolaktinu, který je již u vyšších savců evolučně nadbytečný [24].

#### **1.4.5.1.2 Oxytocin a vasopresin**

Využitím dvojité imunocytohistochemie bylo prokázáno, že neurony produkující PrRP jsou v PVN v kontaktu s neurony, které vylučují oxytocin a vasopresin [36, 52]. Bylo také zjištěno, že neurony, které reagují s protilátkou proti oxytocinu, exprimují receptor GPR10 [53]. Po ICV podání PrRP potkanům byla zjištěna zvýšená koncentrace oxytocinu v plazmě, vyšší hladina vasopresinu byla zjištěna pouze u samic [52].

Jednou z funkcí oxytocinu je účast na regulaci energetického metabolismu a příjmu potravy. Podání cholecystokininu (CCK; jeden z periferních faktorů sytosti) nebo příjem potravy mají za následek aktivaci neuronů hypothalamu produkujících oxytocin [54]. Tento efekt byl výrazně oslaben u PrRP-deficientních myší, což naznačuje, že CCK aktivuje neurony produkující oxytocin alespoň částečně prostřednictvím PrRP [53].

#### **1.4.5.2 Působení PrRP v hypothalamo-hypofýzo-adrenální ose**

Zapojení PrRP do hypothalamo-hypofýzo-adrenální (HPA) osy bylo zkoumáno na základě zjištění, že inervuje paraventriculární jádro (PVN) [37], které obsahuje parvocelulární buňky - hlavní producenty kortikoliberinu (CRH, *corticotropin-releasing hormone*). CRH stimuluje sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH) z adenohypofýzy [46, 48], ten má vliv na vylučování glukokortikoidů z kůry nadledvin [48]. Po centrálním podání PrRP (10 nmol) byla zjištěna zvýšená neurální aktivita CRH-neuronů. Zároveň byla také zvýšená koncentrace ACTH v plazmě, k čemuž nedošlo při současném podání CRH antagonisty, PrRP by tedy mohl působit jako neurotransmitter/neuromodulátor v regulaci CRH neurální aktivity [45].

Neurony produkující PrRP, které inervují PVN, vycházejí z VLM a NTS, kde jsou kolokalizovány s A1 (VLM) a A2 (NTS) noradrenalinovými neurálními populacemi [37]. Tyto noradrenergické neurony jsou známy jako mediátory stresu v centrálním nervovém systému (CNS), jedním z účinků je aktivace HPA, kdy způsobuje uvolnění hypothalamického CRH, což vede ke zvýšení koncentrace ACTH [55]. Společné podání noradrenalinu (NA) a PrRP v dávkách 1 nmol PrRP a 0,1 nmol NA mělo za následek jasné zvýšení plazmatického ACTH, zatímco samostatné podání těchto dávek nemělo na koncentraci ACTH žádný vliv, což ukazuje, že PrRP a NA aktivují HPA ve vzájemné kooperaci [48].

#### **1.4.5.3 Působení PrRP na vnímání bolestivých podnětů**

Částmi mozku účastnicími se odpovědi organismu na bolestivé podněty je PBN a centrální amygdala. Bylo prokázáno, že se zde vyskytuje receptor GPR10 [37] a zároveň jsou tu produkovány také enkefaliny, které vazbou na opioidní receptory tlumí vnímání bolesti [43], dá se proto předpokládat, že by se receptor GPR10 mohl účastnit regulace exprese proenkefalinu [56].

ICV podání PrRP (5nmol) vedlo k hyperalgezii (zvýšená citlivost k vnímání bolestivých podnětů) a zvrátilo analgezii navozenou podáním morfinu. K objasnění důležitosti receptoru GPR10 byly také prováděny testy na myších, které měly vyřazený receptor GPR10. U těch ICV podání PrRP nemělo žádný účinek na práh vnímání bolestivých podnětů, což ukazuje, že účinky PrRP jsou zprostředkovány výhradně prostřednictvím receptoru GPR10. U myší s vyřazeným receptorem GPR10 byl také pozorován zvýšený práh vnímání bolestivých podnětů a vyšší stresem navozená analgezie, která je také zprostředkována opiátovým systémem. Podání naloxonu (antagonista opioidního receptoru) analgezii plně zvrátilo, u kontrolních jedinců nevedlo k žádnému efektu. Tyto výsledky ukazují, že by PrRP-GPR10 systém mohl fungovat jako negativní regulátor opiátového systému [56].

#### **1.4.5.4 Působení PrRP na regulaci příjmu potravy**

Mnoho studií již ukázalo, že PrRP by mohl mít stěžejní roli v regulaci příjmu potravy a energetické rovnováhy. Bylo prokázáno, že centrální podání PrRP snižuje příjem potravy a následně i tělesnou hmotnost [42, 57] a také, že ke snížené transkripci mRNA pro PrRP dochází v DMN, NTS a VLM při stavech s negativní energetickou bilancí, jakými jsou např. hladovění, či kojení [42].

Bylo také zjištěno, že redukce hmotnosti po ICV podání PrRP není výsledkem pouze sníženého množství přijaté potravy, jelikož párově krmení jedinci (ti, kteří dostávali stejné množství potravy jako ti, kterým byl podán PrRP) vykazovali menší úbytek hmotnosti. Podání PrRP vedlo ke zvýšené tělesné teplotě a k vyšší spotřebě kyslíku, což naznačuje zvýšený energetický výdej. Toto podporuje i vyšší produkce mRNA pro rozpojovací protein 1 (*uncoupling protein 1*; UCP-1) v hnědé tukové tkáni [58].

Společné ICV podání PrRP s leptinem mělo za následek aditivní snížení nočního příjmu potravy a tělesné hmotnosti a zároveň zvýšení energetického výdeje. Navíc neurony exprimující PrRP ve všech částech mozku obsahují leptinový receptor [59].

Dalším anorexigenním peptidem, který se pravděpodobně účastní regulace příjmu potravy ve spolupráci se systémem PrRP-GPR10, je CCK. IP podání CCK potkanům má za následek aktivaci PrRP-neuronů v NTS a ve ventrolaterálním jádru (VLRN) [57], naopak u myši s vyřazeným genem pro GPR10 neměl CCK žádný vliv na příjem potravy [60].

Při regulaci příjmu potravy PrRP interaguje také s oxytocinem nebo s CRH. Neurony v NTS obsahující PrRP projektují přímo do PVN [61], kde se nacházejí neurony obsahující CRH nebo oxytocin a které nesou receptor GPR10 [53]. Přestože anorexigenní dávky PrRP aktivují neurony exprimující CRH nebo oxytocin v PVN [60], není možné toto přisoudit specificky signalizaci sytosti, jelikož se tyto neurony účastní také odpovědi na stres (viz kap. 1.4.5.2). Avšak podání antagonisty CRH-receptoru má za následek zvrácení PrRP-navozené anorexie [60], zatímco podání antagonisty receptoru pro oxytocin zvrátí tyto účinky navozené jak podáním PrRP, tak podáním CCK [62].

#### **1.4.6 Vztah mezi strukturou a aktivitou analogů PrRP**

Pro správnou funkci peptidu je důležité zachování struktury jeho C-koncové oblasti včetně zachování amidové skupiny na C-koncovém Phe<sup>31</sup>. Záměna Arg<sup>30</sup>, vede k úplné ztrátě schopnosti vazby peptidu na receptor. Náhrada sedmi C-koncových aminokyselin vede ke snížení afinity [37]. U Phe<sup>31</sup> může být modifikován aromatický kruh, ale musí být zachován odstup C-koncové aminokyseliny od řetězce peptidu, který je zde dán fenylovou skupinou [63]. Analogy PrRP20, u kterých byl Phe<sup>31</sup> modifikován objemným postranním řetězcem nebo u kterých byl jeho aromatický kruh halogenován, vykazují v porovnání s PrRP20 srovnatelnou nebo zvýšenou schopnost vazby, vnitrobuněčné signalizace a uvolňování prolaktinu z buněk RC-4B/C. Po centrálním podání hladovým myším mají tyto analogy signifikantní a dlouhotrvající anorexigenní účinky [64].

##### **1.4.6.1 Lipidizace peptidů**

Peptidy patří mezi klíčové látky v regulaci fyziologických procesů, jejichž velkou výhodou je nízká toxicita a malé riziko vedlejších účinků. Hlavní překážkou jejich



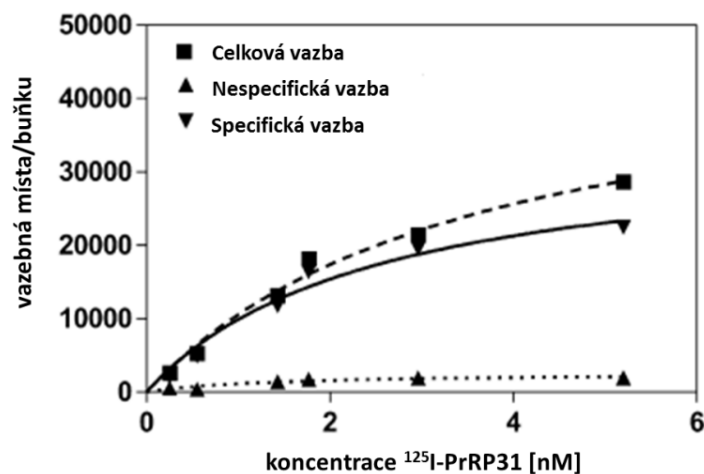
úspěšného používání v terapii je nízká stabilita a biodostupnost za fyziologických podmínek, dalším problémem je nutnost přechodu přes hematoencefalickou bariéru, pokud mají látky působit centrálně. Proto je snaha vytvořit takové analogy, které budou mít vedle stability a vysoké efektivity také potenciál přejít přes hematoencefalickou bariéru [65].

V nedávné době se začalo při navrhování peptidových léčiv využívat lipidizace peptidů, tj. připojení mastné kyseliny k peptidu esterovou nebo amidovou vazbou, což vede ke zvýšení stability a poločasu života léčiva v organismu, zároveň může také umožnit přestup přes hematoencefalickou bariéru [65]. Jako příklad lze uvést buď analog insulínu detemir, který má k molekule insulínu amidovou vazbou navázanou kyselinu myristovou [66], nebo liraglutid, analog glukagonu podobného peptidu (GLP-1; *Glucagon-like peptide 1*), který má navázanou kyselinou palmitovou rovněž amidovou vazbou [67]. Oba tyto lipopeptidy vykazují delší poločas života způsobený jejich vazbou na sérový albumin, a také pomalejší biodegradaci [66, 67].

## 1.5 ÚČINEK PrRP NA BUNĚČNOU LINII RC-4B/C

RC-4B/C je buněčná linie z potkaního adenohypofyzárního adenomu (nezhoubný nádor). Zahrnuje všechny druhy buněk vyskytující se běžně v adenohypofýze – adrenokortikotropy, tyreotropy, somatotropy, laktotropy a gonadotropy. Strukturně buňky odpovídají diferencovaným buňkám předního laloku hypofýzy, avšak vyskytuje se zde o 20 % více buněk, které produkují luteinizační hormon (LH) a o 12 % méně buněk vylučujících růstový hormon (GH). Počet adrenokortikotropů, gonadotropů, laktotropů a tyreotropů zůstává stejný jako ve zdravé hypofyzární tkáni [68].

V naší skupině bylo potvrzeno, že tato buněčná linie obsahuje receptor GPR10, tudíž je vhodná k testování účinků PrRP [64, 69]. Pomocí saturačních vazebných testů s radioaktivně značeným PrRP bylo prokázáno, že PrRP se k této buněčné linii váže s vysokou afinitou v řádu  $10^{-9}$  M. Ukázkový graf saturačních vazebných experimentů je znázorněn na obrázku (Obr. 4, str. 26). Bylo také zjištěno, že PrRP31 a PrRP20 spouští v těchto buňkách cytozolickou signalizační dráhu MAPK/ERK1/2 (mitogenem aktivovaná proteinkinasa/extracelulárním signálem regulovaná kinasa 1/2) [64]. Tato dráha se účastní aktivace translace genu pro PRL [70].



**Obr. 4 Reprezentativní křivky saturačních vazebných experimentů s  $^{125}\text{I}$ -PrRP31 na hypofyzární buněčné linii RC-4B/C [64]**

*Celková vazba je celkové množství radioligandu navázaného na buňku bez přítomnosti kompetitoru, specifická vazba představuje vazbu radioligandu na specifický receptor (zde GPR10), nespecifická vazba udává vazbu radioligandu na jiná místa na buňce než je sledovaný receptor.*

## 2 CÍLE PRÁCE

---

1) *In vitro*: ověřit afinitu nových analogů PrRP k potkanímu receptoru GPR10 spontánně exprimovanému na buňkách hypofyzární buněčné linie RC-4B/C a lidskému receptoru GPR10 transfekovaném na buňkách CHO-K1 a zároveň zjistit afinitu těchto analogů k lidským receptorům NPFF<sub>2</sub> a Y5. Na buňkách CHO-K1 s transfekovaným lidským receptorem GPR10 testovat signalizaci do buněk – fosforylaci MAPK/ERK1/2 působením analogů PrRP.

2) *In vivo*: po subkutánním (SC) podání myším samcům kmene C57Bl/6 zjistit účinky analogů PrRP na příjem potravy, analgesii a sedaci.

## 3 MATERIÁL A METODY

---

### 3.1 MATERIÁL

#### 3.1.1 Chemikálie

|  |   |
|--|---|
| Akrylamid                                    | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| Aminokyseliny                                | Iris Biotech, Marktreidwitz, Německo      |
| Bromfenolová modř                            | Fluka, Buchs, Švýcarsko                   |
| CaCl <sub>2</sub>                            | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| DMEM – <i>high glucose</i> (4,5 g/l)         | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko |
| Dodecylsulfát sodný (SDS)                    | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| Epidermální růstový faktor (EGF)             | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| Fetální hovězí sérum (FBS)                   | Biochrom AG, Berlín, Německo              |
| Fyziologický roztok                          | Infusia, Hořátek, ČR                      |
| D-glukosa bezvodá                            | PENTA, Chrudim, ČR                        |
| L-glutamin 200 mM                            | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko |
| Glycerin bezvodý                             | PENTA, Chrudim, ČR                        |
| Glycin                                       | PENTA, Chrudim, ČR                        |
| Hepes  | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| Hovězí pankreatický inhibitor proteas (BPTI) | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| Hovězí sérový albumin (BSA)                  | Serva GmbH, Heidelberg, Německo           |
| Iodo-Gen                                     | Pierce Chemicals Co., Rockford, IL, USA   |
| KCl  | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| Koňské sérum (HS)                            | Invitrogen Grand Island, NY, USA          |
| Merkaptoethanol                              | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| Methanol                                     | PENTA, Chrudim, ČR                        |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O         | LACHEMA, Brno, ČR                         |
| N,N'-methylenbisakrylamid                    | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |

|   |   |
|---|---|
| N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin<br>(TEMED) | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| NaCl  | LACHEMA, Brno, ČR                         |
| NaF   | PENTA, Chrudim, ČR                        |
| Na <sup>125</sup> I                         | MP Biomedicals, Illkirch, Francie         |
| NaOH  | PENTA, Chrudim, ČR                        |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>             | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| Penicilin/streptomycin                      | PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko |
| Persíran amonný                             | Fluka, Buchs, Švýcarsko                   |
| Polyethylenimin (PEI)                       | Sigma, St. Louis, MO, USA                 |
| Standard Dual color                         | Bio-Rad, Hercules, CA, USA                |
| Standard All blue                           | Bio-Rad, Hercules, CA, USA                |
| Trizma base                                 | Sigma, St. Louis, MO, US                  |
| Tween-20                                    | Serva GmbH, Heidelber                     |

### 3.1.2 Materiály

|                         |                                    |
|-------------------------|------------------------------------|
| Filtry GF/C             | Whatman, Maidstone, Velká Británie |
| PVDF-Immobilon membrána | Sigma, St. Louis, MO, USA          |
| 24jamkové destičky      | Nunc, Roskilde, Dánsko             |

### 3.1.3 Buněčné linie, buněčné membrány

|   |  |
|---|--|
| Buněčná linie RC-4B/C   | ATCC, Manassas, VA, USA                        |
| Buněčná linie CHO-K1 s tranfekovaným<br>lidským receptorem GPR10                          | Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts,<br>USA |
| Buněčné membrány buněk CHO-K1<br>s transfekovaným lidským NPFF <sub>2</sub><br>receptorem | Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts,<br>USA |
| Buněčné membrány buněk HEK293T<br>s transfekovaným lidským receptorem Y5                  | Multispan, Hayward, CA, USA                    |

### 3.1.4 Přístroje

Biohazardní box (EuroFlow S41, Clean Air, Woerden, Nizozemí)

Brandelův přístroj (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MA, USA)

CCD kamera ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad, Herkules, CA, USA)

Centrifuga HETTICH Univerzal 320 (Tuttlingen, Německo)

Centrifuga Jouan C3i/CR 3 (Jouan, Saint-Herblain, Francie)

CO<sub>2</sub> inkubátor (MCO 18AIC, Sanyo, Osaka, Japonsko)

γ-čítač (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)

Horká plotna (TSE systems, Bad Homburg, Německo)

Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Herkules, CA, USA)

VideoMot systém (TSE Systems, Bad Homburg, Německo)

### 3.1.5 Peptidy

Peptidy byly syntetizovány na oddělení peptidové syntézy na ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha metodou syntézy na pevné fázi, jak bylo již dříve popsáno [64]. Byl syntetizován potkaní PrRP31 a PrRP20 (PrRP(12-31)), jejich analogy, u nichž byla na N-konci navázána mastná kyselina, a dále [D-Tyr<sup>1</sup>, (N-Me)-Phe]NPFF (1DMe) pro vazebné testy. Lipidizace analogů PrRP byla provedena podle postupu popsaného v práci [71] jako poslední krok syntézy. Čistota a identita peptidů byla ověřena HPLC a na MS. Peptid YY (PYY), agonista receptoru Y5, byl vyroben v PolyPeptides Laboratories (Strassbourg, France). Primární struktury těchto peptidů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1, str. 31).

**Tab. 1 Primární struktury testovaných peptidů**

| Název peptidu | Struktura  |
|---------------|--|
| rPrRP31       | <i>SRAHQHSMET RTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>               |
| hPrRP31       | <i>SRTHRHSMEIRTPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>                |
| Nle-PrRP31    | <i>SRAHQHS Nle ET RTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>           |
| oct-PrRP31    | <i>(N-oct) SRAHQHS Nle ET RTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>   |
| dec-PrRP31    | <i>(N-dec) SRAHQHS Nle ET RTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>   |
| dodec-PrRP31  | <i>(N-dodec) SRAHQHS Nle ET RTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i> |
| myr-PrRP31    | <i>(N-myr) SRAHQHS Nle ET RTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>   |
| palm-PrRP31   | <i>(N-palm) SRAHQHS Nle ET RTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>  |
| stear-PrRP31  | <i>(N-stear) SRAHQHS Nle ET RTPDINPAWYTGRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i> |
| rPrRP20       | <i>TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>                           |
| oct-PrRP20    | <i>(N-oct)TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>                    |
| dec-PrRP20    | <i>(N-dec)TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>                    |
| dodec-PrRP20  | <i>(N-dodec)TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>                  |
| myr-PrRP20    | <i>(N-myr)TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub></i>                    |
| 1DMe          | <i>D-YL(N-Me)FQPQRF-NH<sub>2</sub></i>                               |
| PYY           | <i>AKPEAPGEDASPEELNRYIASLRHYLNLVTRQRY-NH<sub>2</sub></i>             |

### 3.1.5.1 Jodace peptidů

Peptidy byly jodovány podle postupů uvedených v práci [64] na oddělení Radioizotopy, ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha. Kyslí a lidský PrRP31, 1DMe a PYY byly značeny Na<sup>125</sup>I za využití činidla Iodo-gen<sup>TM</sup> podle pokynů výrobce. PrRP31 byl jodován na tyrosylovém zbytku v pozici 20, 1DMe na tyrosylovém zbytku v pozici 1 a PYY na tyrosylovém zbytku v pozici 1. Specifická aktivita všech peptidů značených <sup>125</sup>I byla přibližně 2000 Ci/mmol. Radioaktivně značené peptidy byly rozděleny do několika alikvotů, uchovány při -20°C a následně spotřebovány při vazebných testech v průběhu 1 měsíce.

## **3.2 POKUSY *IN VITRO***

### **3.2.1 Pěstování buněčných linií**

Buňky potkaní hypofyzární buněčné linie RC-4B/C (ATCC) byly pěstovány v růstovém médiu DMEM (pH 7,4), do kterého bylo přidáno 10 % tepelně inaktivovaného hovězího séra (FBS) a 2,5 ng/ml epidermálního růstového faktoru (EGF). Buňky CHO-K1 s receptorem GPR10 (Perkin Elmer) byly pěstovány v HAM'S F-12 médiu (pH 7,4) obohaceném 10% FBS. Do obou médií byl přidán L-glutamin ve výsledné koncentraci 2 mM, a 1% streptomycin/penicilin.

Všechny buňky byly pěstovány při 37°C v atmosféře obohacené 5 % oxidem uhličitým. Médium bylo měněno každé 2-3 dny, pasážování buněk bylo prováděno po 3-4 dnech, podle počtu buněk.

Pro provádění vazebných testů i pro sběry buněk k prokázání buněčné signalizace byly buňky pěstovány na 24jamkových destičkách (Nuclon<sup>TM</sup>, NUNC, Roskilde, Dánsko). Z důvodu větší přilnavosti buněk a větší odolnosti během pokusů byla dna destiček potažena polylysinem (RC-4B/C) nebo polyethyleniminem (CHO-K1).

### **3.2.2 Vazebné experimenty**

Buněčná linie RC-4B/C byla pro vazebné pokusy pěstována na 24jamkových destičkách do počtu 300-450 tisíc buněk/jamku. Buněčná linie CHO-K1 s receptorem GPR10 byla také pěstována na 24jamkových destičkách, do počtu 90 tisíc buněk/jamku. Všechny vazebné testy byly prováděny ve vazebných pufrech, jejich přehled je v tabulce (Tab. 2, str. 33).



**Tab. 2 Přehled vazebných pufrů používaných při vazebných experimentech**

| Buněčná linie |  | Složení pufru  |
|---------------|--|--|
| <b>Pufr 1</b> | RC-4B/C                                      | 20 mM Hepes pH 7,4 + 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa, 0,1 mg/ml BPTI            |
| <b>Pufr 2</b> | CHO-K1<br>s receptorem<br>GPR10              | 25 mM Hepes pH 7,4 + 118 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,5% BSA, 2 g/l glukosa                 |
| <b>Pufr 3</b> | CHO-K1<br>s receptorem<br>NPFF <sub>2</sub>  | 50 mM Tris pH 7,4 + 60 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mg/ml BSA   |
| <b>Pufr 4</b> | HEK293T Gαq <sub>i5</sub><br>s receptorem Y5 | 25 mM Hepes pH 7,4 + 118 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 4,7 mM KCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,5% BSA, 1 mg/ml bacitracin |

Při vazebných testech na 24jamkových destičkách byly buňky nejprve promyty promývacím pufrém (10 mM HEPES pH 7,4; 118 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4,7 mM KCl), stejným pufrém byly buňky promyty i po ukončení inkubace. Poté byly buňky solubilizovány v 0,1 M (RC-4B/C) nebo 0,5 M (CHO-K1) roztoku NaOH po dobu 15 minut. Lyzáty byly sesbírány do plastových zkumavek a poté byla na γ-čítači změřena radioaktivita navázaná na buňkách.

Při vazebných testech s buněčnými membránami s transfekovaným lidským NPFF<sub>2</sub> receptorem nebo s buněčnými membránami s lidským receptorem Y5 byla inkubace zakončena rychlou filtrací na Brandelově přístroji přes GF/C filtr. Filtry byly před použitím po dobu minimálně 30 minut v promývacím pufru (10 mM Hepes pH 7,4, 118 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4,7 mM KCl) s polyethyleniminem (PEI). Následně byla na γ-čítači (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) proměřena radioaktivita navázaná na buněčných membránách.

Všechny pokusy byly prováděny v duplikátech a alespoň třikrát opakovány.

### 3.2.2.1 Optimalizace podmínek vazebných experimentů

Optimální podmínky pro vazebné pokusy s PrRP31 na buňkách RC-4B/C byly zjištěny v práci [64] a pro vazbu 1DMe k membránám buněk CHO-K1 s transfekovaným receptorem NPFF<sub>2</sub> v práci [23, 69].

Vazba PrRP31 k buňkám CHO-K1 s receptorem GPR10 byla optimalizována ve vazebném pufru 2 (viz kap. 3.2.2, Tab. 2, str. 33) z hlediska počtu buněk a délky inkubace.

Všechny testy byly provedeny 1 - 2x, vždy v duplikátech.

V následujících třech kapitolách jsou uvedeny optimalizované vazebné podmínky.

### **3.2.2.2 Saturační vazebné experimenty na buňkách CHO-K1 s lidským receptorem GPR10**

Při saturačních vazebných experimentech pro stanovení celkové vazby ( $B_t$ ) byly buňky v počtu 90 tisíc buněk/jamku inkubovány s finálními koncentracemi  $^{125}\text{I}$ -hPrRP31 v rozmezí 0,5 – 5 nM v celkovém objemu 250  $\mu\text{l}$ /jamku. Pro stanovení nespecifické vazby ( $B_{\text{nsp}}$ ) byla k příslušným koncentracím radioligandu do jamek pipetován také neznačný peptid PrRP31 ve finální koncentraci  $10^{-5}$  M. Destičky byly za stálého třepání inkubovány při 25°C po dobu 60 minut. Jako vazebný pufr byl použit pufr č. 2 (viz kap. 3.2.2, Tab. 2, str. 33).

### **3.2.2.3 Kompetitivní vazebné experimenty na buňkách RC-4B/C a CHO-K1 s receptorem GPR10**

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny ve 24jamkových destičkách v celkovém objemu 250  $\mu\text{l}$ /jamku. Byl použit vazebný pufr 1 (RC-4B/C) nebo 2 (CHO-K1), viz kap. 3.2.2, Tab. 2, str. 33). Do jamky byly napipetovány neznačené peptidy s finální koncentrací v rozmezí  $10^{-12}$  M až  $10^{-5}$  M (PrRP20, PrRP31 a jejich analogy) a radioaktivně značený peptid: 0,1 nM  $^{125}\text{I}$ -rPrRP31 (kryší homolog PrRP; na buňkách RC-4B/C) nebo 0,03 nM  $^{125}\text{I}$ -hPrRP31 (CHO-K1). Pro zjištění celkové vazby byl do jamky pipetován místo neznačeného peptidu příslušný vazebný pufr. Poté byla destička inkubována za laboratorní teploty po dobu 60 minut.

### **3.2.2.4 Kompetitivní vazebné experimenty na membránách s lidským receptorem NPFF<sub>2</sub> nebo Y5**

Vazebné testy na buněčných membránách byly prováděny ve zkumavkách v celkovém objemu 250  $\mu\text{l}$ /zkumavku.

Testy na membránách s receptorem NPFF<sub>2</sub> byly provedeny podle návodu výrobce. Membrány izolované z buněk CHO-K1 s transfekovaným lidským receptorem NPFF<sub>2</sub> (Perkin Elmer, RBHNF2M400UA) byly naředěny vazebným pufr 3 (viz kap. 3.2.2, Tab. 2, str. 33) tak, aby výsledná koncentrace bílkovin byla 3 µg/zkumavku. Membrány byly inkubovány s nezačleněným ligandem ve finální koncentraci  $10^{-12} - 10^{-4}$  M, příp. pouze vazebným pufr 3 pro zjištění celkové vazby, a <sup>125</sup>I-1DMe ve finální koncentraci 0,1 nM po dobu 120 minut při pokojové teplotě na třepačce s vodou.

Membrány buněk HEK s transfekovaným lidským Y5 receptorem (Multispan, MCG1275-11222013) byly naředěny vazebným pufr 4 (viz kap. 3.2.2, Tab. 2, str. 33) na výslednou koncentraci bílkovin 20 µg/zkumavku. Do každé zkumavky byl pipetován nezačleněný ligand ve finální koncentraci v rozmezí  $10^{-11} - 10^{-6}$  M (PYY) nebo  $10^{-9} - 10^{-4}$  M (palm-PrRP31), nebo vazebný pufr pro celkovou vazbu, a 0,1 nM <sup>125</sup>I-PYY. Po přidání membrán do zkumavek probíhala inkubace 90 minut při pokojové teplotě za stálého míchání na třepačce s vodou.

### **3.2.3 Spouštění signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 do buněk CHO-K1 s receptorem GPR10 účinkem PrRP a jeho analogů**

#### **3.2.3.1 Sběr vzorků**

K prokázání, že dané peptidy spouštějí signalizační dráhu MAPK/ERK1/2, byly použity vzorky z lyzátů buněk CHO-K1 s transfekovaným lidským receptorem GPR10. Buňky byly nality na 24jamkové destičky v hustotě 3000 buněk/jamku a byly nechány růst v kompletním médiu po dobu 3 dnů na finální počet přibližně 90 tisíc buněk/jamku.

20 hodin před experimentem bylo médium vyměněno za médium bez séra. Buňky byly inkubovány s PrRP31, PrRP20, palm-PrRP31 nebo myr-PrRP20 ve finálních koncentracích v rozmezí  $10^{-13}$  až  $10^{-7}$  M při 37°C po dobu 5 minut. Jako kontrola byly použity buňky, na které nebyl aplikován žádný peptid. Po uplynutí doby inkubace byla destička dána na led, jamky byly třikrát promyty promývacím pufr (fosfátový pufr PBS pH 7,4, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 1,76 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) o teplotě 4°C. Poté byly buňky solubilizovány vzorkovým pufr na SDS elektroforézu (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 5% merkaptoethanol, 50 mM NaF a 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), lyzáty byly sebrány do mikrozkupek a uschovány při -20°C.

Všechny sběry byly provedeny minimálně třikrát.

#### **3.2.3.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v SDS prostředí**

Elektroforéza byla provedena v 5%/12% polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) na přístroji Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Před nanesením na gel byly vzorky 1 minutu sonikovány, 2 minuty zahřívány při 100°C a centrifugovány při 500 x g a 25°C po dobu 2 minut. Elektroforéza probíhala v elektrodovém pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 1% SDS) za konstantního napětí nejprve po dobu 10 minut při 100 V a následně asi 60 minut při 200 V.

#### **3.2.3.3 Přenos proteinů na membránu**

Proteiny byly přeneseny z elektroforetických gelů na polyvinyliden difluoridovou (PVDF) membránu Immobilon<sup>TM</sup>-P metodou tzv. přenosu označovanou jako Western blot (z anglického „*blotting*“). Přenos probíhal za konstantního napětí 30 V přes noc při 4°C v blotovacím pufru (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glycin, 20% metanol).

### 3.2.3.4 Imunochemická detekce proteinů na membráně

Membrány s přenesenými proteiny byly promývány v promývacím TBS pufru (*Tris-Buffered Saline*; 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl a 0,1% Tween-20) po dobu 5 minut. Poté byly přeneseny do blokovacího pufru (5% odtučněné sušené mléko, 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> a 50 mM NaF) a zde za laboratorní teploty 1 hodinu inkubovány. Následně byly znovu promyty v TBS pufru (3x po dobu 5 minut) a poté na ně byla aplikována primární protilátka ředěná v blokovacím pufru, se kterou byly opět 1 hodinu inkubovány. Seznam používaných protilátek s daným ředěním je uveden v tabulce (Tab. 3). Následovalo další promytí membrán v pufru TBS (opět 3x po 5 minutách) a poté byly membrány inkubovány se sekundární protilátkou (Tab. 3), opět 1 hodinu. Potom byly membrány znovu promyty 3x po 5 minutách v TBS pufru. Působení substrátu pro křenovou peroxidasu (HRP; Luminata Crescendo Western HRP substrate; Merc Millipore, Billerica, MA, USA) vyvolalo chemiluminiscenci, která byla detekována pomocí CCD kamery ChemiDoc™ MP Systém (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

**Tab. 3 Přehled protilátek využívaných k detekování proteinů na membránách**

*Protilátky byly ředěny v blokovacím pufru (viz kap. 3.2.3.4).*

| Protilátka  | Základní látka   | Ředění |
|---|--|--------|
| <b>primární</b><br><b>P-MAPK</b>                          | <i>Myší monoklonální protilátka proti phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204); (Cell Signalling Technology, Beverly MA, USA)</i> | 1:2000 |
| <b>primární</b><br><b>MAPK</b>                            | <i>Myší monoklonální protilátka proti p44/42 MAPK (Cell Signalling Technology, Beverly MA, USA)</i>                          | 1:2000 |
| <b>primární Aktin</b>                                     | <i>Králičí monoklonální protilátka proti aktinu (Sigma, St. Louis, MO, USA)</i>  | 1:2000 |
| <b>sekundární</b><br><b>proti myšímu</b><br><b>IgG</b>    | <i>Konjugát protilátky proti myšímu IgG připravené v koni s HRP (Cell Signalling Technology, Beverly MA, USA)</i>            | 1:2000 |
| <b>sekundární</b><br><b>proti</b><br><b>králičímu IgG</b> | <i>Konjugát protilátky proti králičímu IgG připravené v koze s HRP (Cell Signalling Technology, Beverly MA, USA)</i>         | 1:2000 |

### 3.2.4 Vyhodnocení *in vitro* experimentů

K vyhodnocení výsledků byl použit program Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA), při vyhodnocování výsledků vazebných experimentů byla použita metoda nelineární regrese za předpokladu jednoho vazebného místa.

Rovnováha mezi disociací a asociací komplexu ligand-receptor je důležitá pro správné provedení vazebných experimentů. Je charakterizována rovnovážnou disociační konstantou,  $K_d$ , ta představuje molární koncentraci ligandu, při které ligand obsadí polovinu všech receptorů. S tím souvisí také afinita vazby ligandu k receptoru – čím nižší je  $K_d$ , tím vyšší je afinita vazby k receptoru [72].

$$\frac{[\text{ligand}] \times [\text{receptor}]}{[\text{ligand} - \text{receptor}]} = K_d$$

Za specifickou vazbu,  $B_{sp}$ , se označuje stav, kdy se radioligand váže na konkrétní receptor. Vazbu na jiná místa označujeme jako vazbu nespecifickou,  $B_{nsp}$ . Celkovou vazbu pak tvoří součet  $B_{sp}$  a  $B_{nsp}$ , který udává celkové množství navázaného radioligandu [72].

Hodnotu  $K_d$  lze zjistit ze saturačních vazebných experimentů, odkud lze určit i celkový počet receptorů,  $B_{max}$ .

Z kompetitivních vazebných testů lze zjistit hodnotu poloviční inhibiční koncentrace,  $IC_{50}$ , její hodnota říká při jaké koncentraci je neznačený peptid v přítomnosti radioligandu navázán právě na polovinu receptorů. Z  $IC_{50}$  lze vypočítat hodnotu inhibiční konstanty neznačeného ligandu,  $K_i$ , která vyjadřuje koncentraci neznačeného ligandu navázaného na polovinu receptorů za nepřítomnosti radioligandu nebo jiného kompetitoru [72]. Její hodnotu lze vypočítat dosazením do rovnice Chenga a Prussofa [73]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[\text{radioligand}]}{K_d}} \text{ [M]}$$

Hodnota  $IC_{50}$  byla získána z kompetitivních vazebných testů, hodnota  $K_d$  ze saturačních vazebných experimentů prováděných za podobných podmínek jako vazebné testy kompetitivní [72]. Pro vazbu  $^{125}\text{I}$ -PrRP31 k buněčné linii RC-4B/C byla již dříve zjištěna hodnota  $K_d$  4,21 nM [64], pro vazbu  $^{125}\text{I}$ -1DMe k receptoru NPFF<sub>2</sub> 0,72 nM [23, 69].

Kvantifikace fosforylovaného a celkového MAPK/ERK1/2 byla provedena denzitometrickým stanovením pomocí programu Image Lab 4.0.1. (Bio-Rad, Hercules, CA,

USA). Pro vyhodnocení spouštění signální dráhy v závislosti na koncentraci peptidu byl nejprve zjištěn poměr fosforylovaného ERK a celkového aktinu přítomného ve vzorku a následně byla použita metoda nelineární regrese, z které byla stanovena hodnota poloviční efektivní koncentrace  $EC_{50}$ , tj. koncentrace peptidu, která způsobí 50 % možného účinku. Celkový ERK byl stanoven jako potvrzení, že ho ve vzorcích bylo srovnatelné množství.

Naměřená data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  S.E.M. (střední chyba průměru), byla stanovena alespoň ze tří na sobě nezávislých měření provedených v duplikátu.

### **3.3 POKUSY *IN VIVO***

#### **3.3.1 Experimentální zvířata**

Experimenty byly prováděny na myších samcích kmene C57Bl/6 (Charles River, Německo) chovaných v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha, v areálu ústavů Akademie věd v Krči. Při práci se zvířaty byl dodržován zákon o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.), protokol pokusu byl schválen resortní komisí AV ČR pro ochranu zvířat. Byla udržována teplota prostředí  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , rytmus světlo/tma byl nastaven na 12/12 hodin, přičemž začátek světla byl v 6:00. Zvířata měla volný přístup k potravě i k pití, byla krmena standardní dietou St-1 (Mlýn Kocanda, Praha, ČR) s obsahem 66 % sacharidů, 25 % proteinů a 9 % tuků, energetická hodnota výživy byla 3,4 kcal/g.

#### **3.3.2 Test příjmu potravy po podání analogů PrRP**

Před začátkem testování příjmu potravy byli myši samci náhodně rozděleni do skupin po 6-8. 17 hodin před začátkem pokusu jim byla odebrána potrava, ale měli zachován volný přístup k pití.

V den pokusu bylo myším subkutánně (SC) podáno 200  $\mu\text{l}$  fyziologického roztoku (kontrolní jedinci) nebo analogy PrRP v dávce 5 mg/kg (rozpuštěné ve fyziologickém roztoku). Závislost účinku na dávce byla zjišťována pro palm-PrRP31 a myr-PrRP20, testovány byly dávky 1 a 5 mg/kg. 15 minut po aplikaci byla myším dána předem zvážená potrava (peleta), ta byla následně každých 30 minut vážena po dobu nejméně 6 hodin. Během experimentu měla zvířata volný přístup k pití.

### 3.3.3 Zjištění sedativních účinků peptidů testem v otevřeném poli

Vliv na pohybovou aktivitu byl zjišťován testem v otevřeném poli – angl. *Open field* – za využití systému VideoMot (TSE Systems, Bad Homburg, Německo), metoda je popsána v práci [74]. V tomto testu byla měřena vzdálenost, kterou myši urazily v otevřeném prostoru (o velikosti 0,5 x 0,5 m) za dobu 10 minut. Naměřená vzdálenost odráží sedativní, resp. excitační účinky testovaných peptidů. Myším byly látky podány SC 15 minut před zahájením testu v dávce 5 mg/kg, testovány byly účinky Nle-PrRP31, oct-PrRP31, palm-PrRP31 a myr-PrRP20.

Před zahájením testu měla zvířata volný přístup k potravě i k vodě.

### 3.3.4 Zjištění analgetických účinků peptidů pomocí testu na horké plotně

Analgetické účinky podaných látek byly testovány na horké plotně o teplotě 53°C (angl. „*hot plate*“; TSE Systems, Bad Homburg, Německo) podle postupu popsaného v práci [75], experiment byl prováděn ihned po ukončení testu v otevřeném poli. Byl měřen čas nutný k vyvolání bolesti způsobené tepelným drážděním končetin myších samců, zaznamenány byly dvě hodnoty – kdy si samci začali lízat přední packy a kdy na horké plotně vyskočili. Okamžitě po skoku byl pokus ukončen a myš byla z horké plotny sundána. V případě, že myš nevykazovala žádnou aktivitu, byla sundána po uplynutí 1 min.

### 3.3.5 Statistické vyhodnocení experimentů *in vivo*

Získaná data jsou uváděna jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA) metodou jednocestná ANOVA následovaná Dunnettovým post-hoc testem. Za statisticky významné byly považovány výsledky, kdy  $P < 0,05$ .



## 4 VÝSLEDKY

---

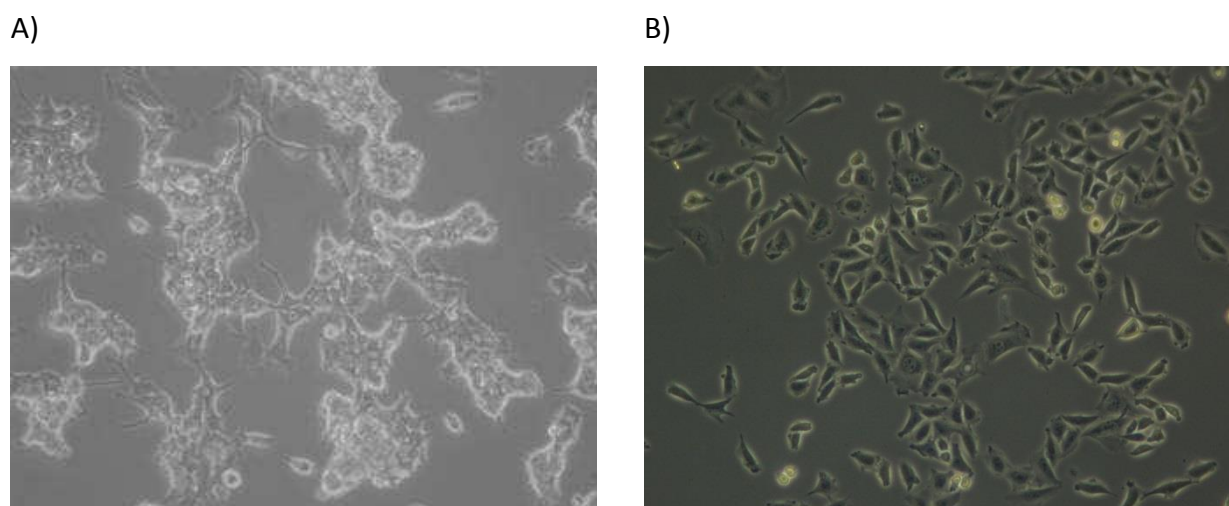
### 4.1 POKUSY *IN VITRO*

#### 4.1.1 Pěstování buněčných linií

Testy *in vitro* byly prováděny na buněčných liniích RC-4B/C a CHO-K1 s transfekovaným receptorem GPR10. RC-4B/C je buněčná linie z potkaního adenohypofyzárního adenomu. Zahrnuje všechny typy buněk, které se běžně v adenohypofýze vyskytují, proto také obsahuje velké množství receptorů, mimo jiné receptor GPR10 i receptor NPFF<sub>2</sub>. Pro vazebné experimenty byla pěstována na 24jamkových destičkách do počtu 300-450 tisíc buněk/jamku.

Buněčná linie z ovarií čínského křečka CHO-K1 je stabilně transfekovaná lidským receptorem GPR10. Pro vazebné pokusy i pro sběr vzorků k prokázání spouštění signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 byla také pěstována na 24jamkových destičkách, avšak do počtu přibližně 100 tisíc buněk/jamku.

Obě buněčné linie byly pěstovány za stálých podmínek uvedených v kapitole 3.2.1. Typické tvary buněk těchto linií jsou ukázány na obrázku (Obr. 5).



**Obr. 5 Buňky A) hypofyzární buněčné linie RC-4B/C, B) buněčné linie CHO-K1 s lidským receptorem GPR10**

*Buňky po 48 h růstu v kultivační láhvi s růstovým médiem, fotografie byla pořízena při zvětšení 40x.*

#### 4.1.2 Vazebné experimenty

##### 4.1.2.1 Optimalizace podmínek vazebných experimentů na buňkách CHO-K1 s receptorem GPR10

Pro zjištění optimálních podmínek byla porovnávána celková ( $B_t$ ) a nespecifická vazba ( $B_{nsp}$ ), za optimálních podmínek by  $B_t$  měla představovat maximálně 10 % radioaktivity celkově obsažené v roztoku.  $B_{nsp}$  by neměla přesáhnout 15 % z  $B_t$  [72].

Byl testován vliv doby inkubace, kdy bylo vyzkoušeno 30 a 60 minut. Celková vazba ani poměr nespecifické a celkové vazby nebyly v obou časech výrazně rozdílné, přičemž o něco nižší byla  $B_{nsp}$  při inkubaci 60 minut, proto byla určena jako optimální. Dalším důvodem pro zvolení této doby inkubace bylo, že se tato doba shodovala s dobou inkubace používanou v literatuře a také, že stejná doba inkubace byla již dříve prokázána jako vhodná pro vazbu k buňkám RC-4B/C. Hodnoty radioaktivity navázané na buňkách (celková vazba), nespecifická vazba a poměr  $B_{nsp}/B_t$  jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4).

**Tab. 4 Celková ( $B_t$ ) a nespecifická ( $B_{nsp}$ ) vazba při různých dobách inkubace**

| Doba inkubace [min] | $B_t$ [cpm] | $B_{nsp}$ [cpm] | $B_{nsp}/B_t$ [%] |
|---------------------|-------------|-----------------|-------------------|
| 30                  | 55400 ± 400 | 1070 ± 50       | 1,9               |
| 60                  | 51700 ± 600 | 370 ± 40        | 1,3               |

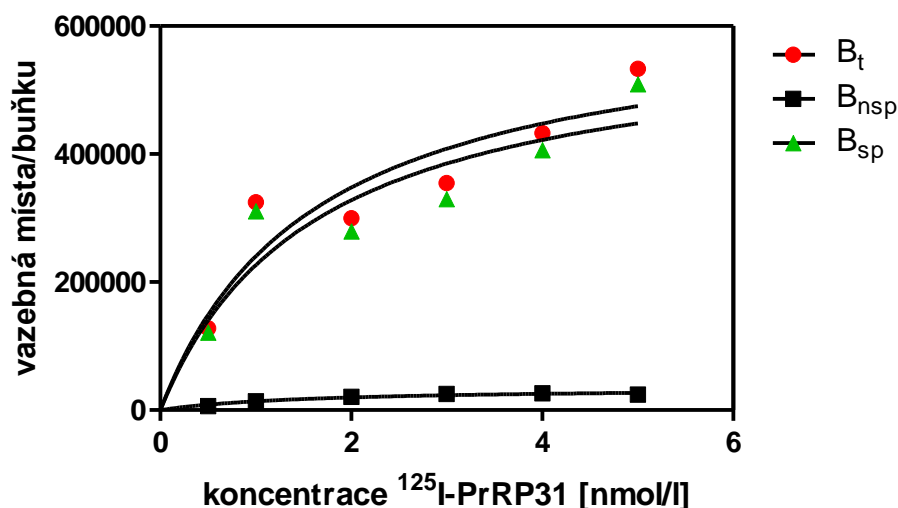
Z pokusů, kdy byly buňky v 24jamkových destičkách pěstovány z různého počtu (3, 5, 7, 10 a 15 tisíc buněk/jamku). Finální hustota buněk v den pokusu byla přibližně 90, 150, 210, 300 a 450 tisíc buněk/jamku. Byla zvolena optimální hustota buněk při nalévání 3000/jamku, jelikož vyšší počet buněk nezlepšil výrazně poměr  $B_{nsp}/B_t$ . Celková vazba, nespecifická vazba a jejich poměr jsou uvedeny v tabulce (Tab. 5, str. 43).

**Tab. 5 Celková ( $B_t$ ) a nespecifická ( $B_{nsp}$ ) vazba při různých počtech buněk nalitých na 24jamkovou destičku**

| Počet nalitých buněk/jamku | Finální počet buněk/jamku | $B_t$ [cpm] | $B_{nsp}$ [cpm] | $B_{nsp}/B_t$ [%] |
|----------------------------|---------------------------|-------------|-----------------|-------------------|
| 3000                       | 90000                     | 10500 ± 700 | 200 ± 10        | 1,9               |
| 5000                       | 150000                    | 12800 ± 500 | 160 ± 10        | 1,3               |
| 7000                       | 210000                    | 14500 ± 60  | 160 ± 20        | 1,1               |
| 10000                      | 300000                    | 9400 ± 200  | 110 ± 10        | 1,2               |
| 15000                      | 450000                    | 9000 ± 1100 | 170 ± 10        | 1,8               |

#### 4.1.2.2 Interakce $^{125}$ I-hPrRP31 s receptorem GPR10

Interakce  $^{125}$ I-hPrRP31 s receptorem GPR10 byla zjišťována pomocí saturačních vazebných experimentů, ze kterých byla určena rovnovážná disociační konstanta radioligandu a maximální počet vazebných míst/buňku. Pokusy byly provedeny na buněčné linii CHO-K1 s tranfekovaným lidským receptorem GPR10 podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2.2. V pokusu byl použit radioligand v rozmezí finálních koncentrací 0,5 – 5 nM, pro zjištění nespecifické vazby byl přidán ještě neznačený peptid hPrRP31 ve finální koncentraci  $10^{-5}$  M. Bylo zjištěno, že  $^{125}$ I-hPrRP31 se váže k receptoru GPR10 s vysokou afinitou a nízkou nespecifickou vazbou. Byly určeny hodnoty  $K_d$   $1,05 \pm 0,36$  nM a  $B_{max}$   $482000 \pm 170000$ . Reprezentativní vazebná křivka  $^{125}$ I-hPrRP31 je znázorněna na obrázku (Obr. 6, str. 44).



**Obr. 6** Reprezentativní křivka ze saturačních vazebných experimentů s  $^{125}\text{I-PrRP31}$  na buňkách CHO-K1 s receptorem GPR10

$B_t$  představuje celkovou vazbu  $^{125}\text{I-PrRP31}$  o finální koncentraci v rozmezí 0,5 až 5 nM,  $B_{nsp}$  ukazuje vazbu dané koncentrace  $^{125}\text{I-PrRP31}$  a neznačeného PrRP31 ve finální koncentraci  $10^{-5}$  M,  $B_{sp}$  byla určena jako rozdíl  $B_t$  a  $B_{nsp}$ . Inkubace probíhala 60 min při pokojové teplotě ve vazebném pufru 2 (složení viz kapitola 3.2.2).

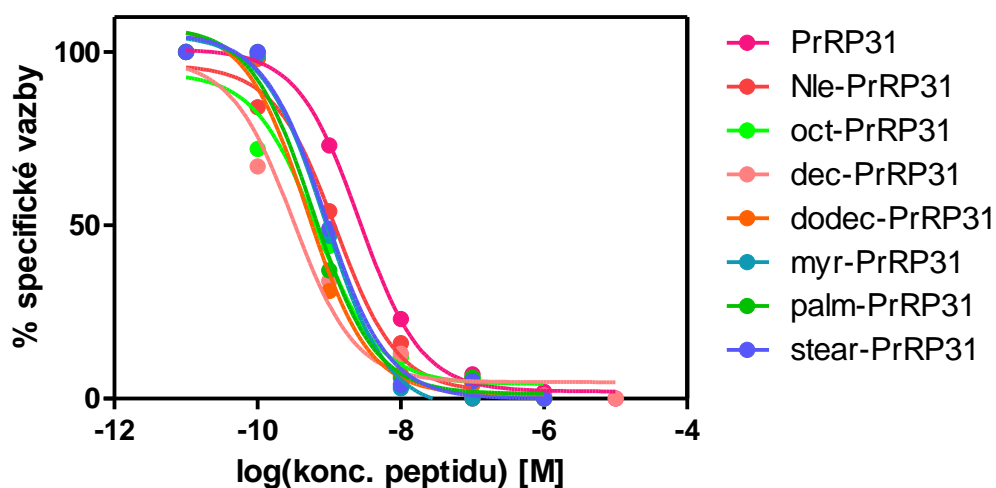
#### 4.1.2.3 Vazba analogů PrRP k buňkám RC-4B/C

Vazba analogů PrRP31 i PrRP20 k buňkám potkaní hypofyzární buněčné linie RC-4B/C, která spontánně exprimuje receptor GPR10, byla testována pomocí kompetitivních vazebných experimentů. Pokusy byly provedené za optimálních podmínek zjištěných v práci [64] s dobou inkubace 60 minut ve vazebném pufru 1 (viz kap. 3.2.2). Buňky byly inkubovány s neznačenými peptidy v rozmezí finálních koncentrací  $10^{-12}$  –  $10^{-5}$  M. Celková vazba představovala asi 10 % z celkové radioaktivity použité při experimentu (0,1 nM), nespecifická vazba tvořila asi 5 % vazby celkové.

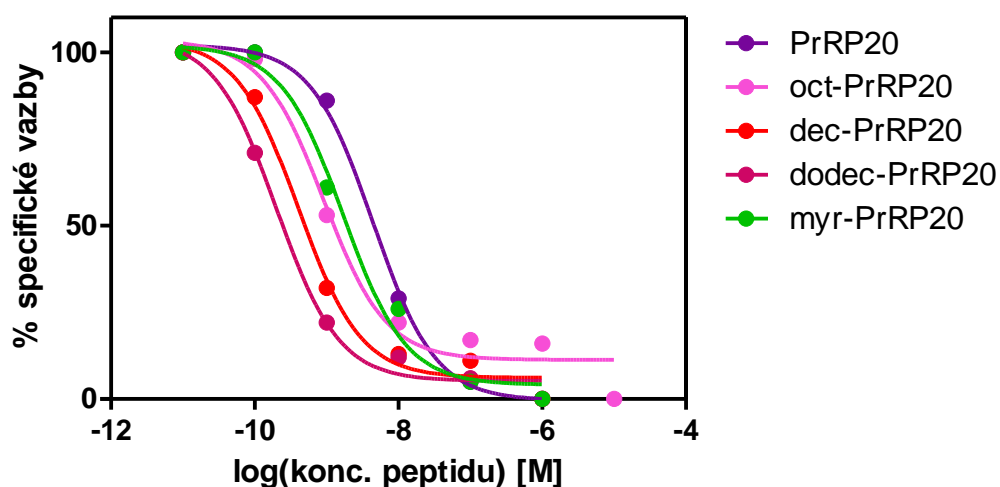
Všechny testované analogy se k buňkám RC-4B/C vázaly s vysokou afinitou, analogy s navázanou mastnou kyselinou dokonce s větší afinitou než analogy bez mastné kyseliny.  $K_i$  pro PrRP31, Nle-PrRP31 a PrRP20 byla zjištěna v řádu  $10^{-9}$  M, zatímco všechny analogy s mastnou kyselinou měly  $K_i$  v řádu  $10^{-10}$  M. Hodnoty inhibičních konstant neznačených peptidů  $K_i$  byly zjištěny dosazením naměřených  $IC_{50}$  do rovnice Chenga a Prusoffa [73], kdy za  $K_d$  byla dosazena hodnota 4,21 nM [64], koncentrace radioligandu byla 0,1 nM.

Hodnoty  $K_i$  (průměr  $\pm$  S.E.M.) jsou uvedeny v tabulce, kde jsou shrnuty výsledky všech vazebných experimentů (Tab. 6, str. 52). Grafy s typickými vazebnými křivkami pro jednotlivé analogy jsou uvedeny na obrázku (Obr. 7).

A)



B)



**Obr. 7 Reprezentativní křivky A) PrRP31 a jeho analogů, B) PrRP20 a jeho analogů z kompetitivních vazebných experimentů na buňkách RC-4B/C**

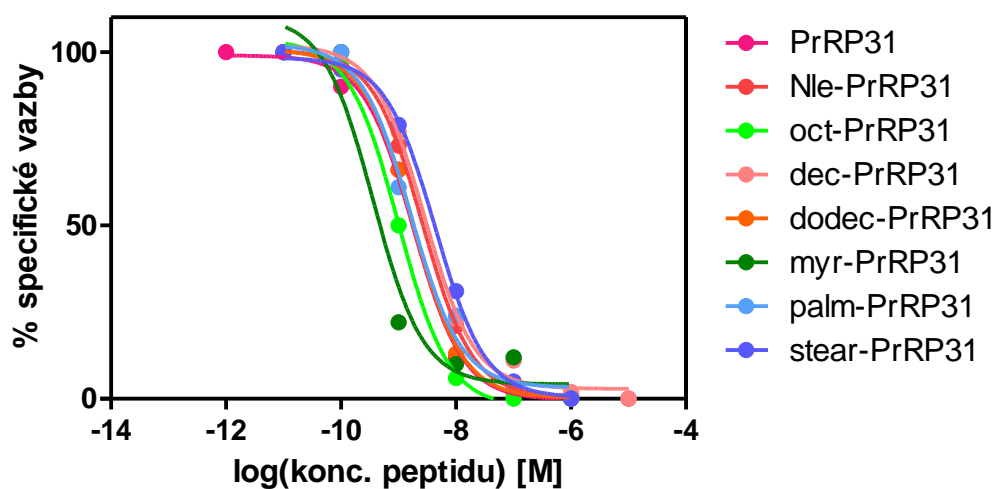
Kompetitivní vazebné experimenty probíhaly ve vazebném pufru 1 (složení viz kap. 3.2.2) s inkubací 60 minut při pokojové teplotě. Specifická vazba byla určena odečtením nespecifické vazby (vazba za přítomnosti  $0,1 \text{ nM } ^{125}\text{I-PrRP31}$  a  $10^{-5} \text{ M}$  příslušného neznačeného peptidu), vyjádřena je v procentech, 100 % je vazba  $0,1 \text{ nM } ^{125}\text{I-PrRP31}$  za přítomnosti neznačeného peptidu v nejnižší koncentraci (tj.  $10^{-11} \text{ M}$ ).

#### 4.1.2.4 Vazba analogů PrRP k lidskému receptoru GPR10

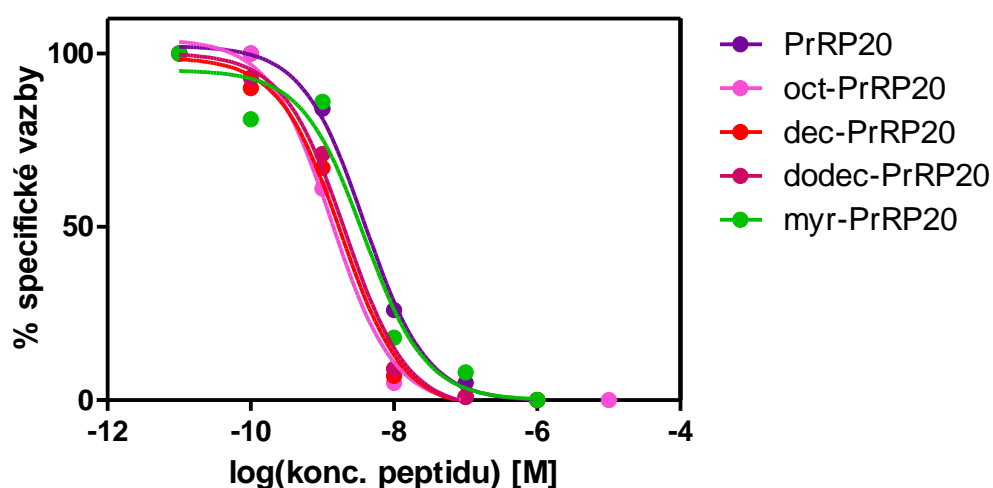
Pro zjištění vazby analogů PrRP31 a analogů PrRP20 k lidskému receptoru GPR10 byly provedeny kompetitivní vazebné experimenty, ke kterým byly použity buňky CHO-K1 se stabilně transfekovaným lidským receptorem GPR10. Vazebné experimenty byly provedeny za zjištěných optimálních podmínek (kap. 4.1.3.1), buňky byly inkubovány s neznačenými analogy PrRP v rozmezí finálních koncentrací  $10^{-12}$  –  $10^{-5}$  M. Celková vazba představovala asi 30 % z celkové radioaktivity použité při experimentu (0,03 nM), nespecifická vazba tvořila asi 5 % vazby celkové.

U všech testovaných analogů byla zjištěna vysoká afinita k receptoru GPR10 s  $K_i$  v řádu  $10^{-9}$  M, pro analog myr-PrRP31 dokonce o něco nižší, řádově  $10^{-10}$  M. Pro výpočet  $K_i$  byla za  $K_d$  dosazena hodnota zjištěná ze saturačních vazebných experimentů na buňkách CHO-K1 s lidským receptorem GPR10, tj. 1,05 nM (kap. 4.1.3.2), koncentrace  $^{125}\text{I}$ -hPrRP31 byla 0,03 nM. Vypočítané hodnoty konstant  $K_i$  jsou uvedeny v tabulce shrnující výsledky všech vazebných pokusů (Tab. 6, str. 52). Reprezentativní vazebné křivky jednotlivých peptidů jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 8, str. 47).

A)



B)



**Obr. 8 Reprezentativní křivky A) PrRP31 a jeho analogů, B) PrRP20 a jeho analogů z kompetitivních vazebných experimentů na buňkách CHO-K1 s lidským receptorem GPR10**

Inkubace probíhala ve vazebném pufru 2 (složení viz kap 3.2.2) za pokojové teploty po dobu 60 minut. Specifická vazba byla určena odečtením nespecifické vazby (vazba za přítomnosti 0,03 nM  $^{125}$ I-PrRP31 a  $10^{-5}$  M neznačeného peptidu), vyjádřena je v procentech, 100 % je vazba 0,03 nM  $^{125}$ I-PrRP31 za přítomnosti neznačeného peptidu v nejnižší koncentraci (tj.  $10^{-11}$  M, příp.  $10^{-12}$  M pro PrRP31).

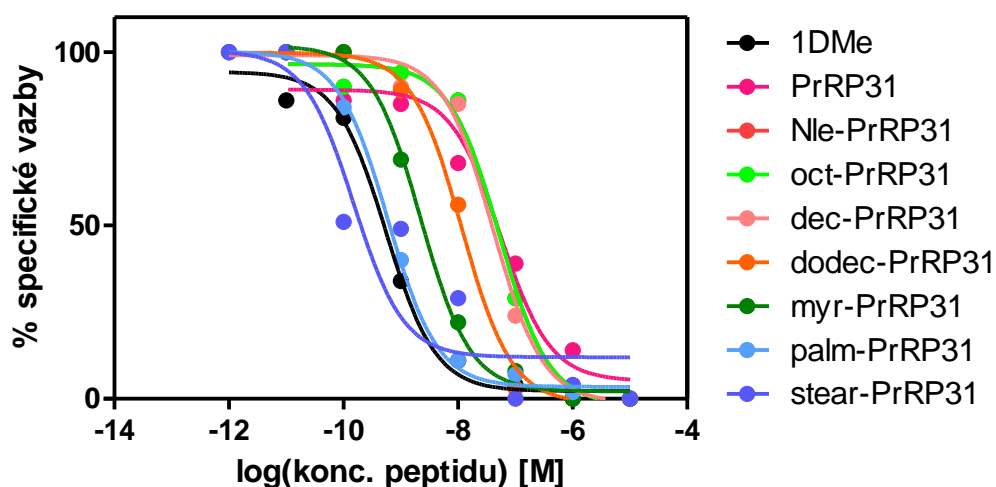
#### 4.1.2.5 Vazba analogů PrRP k lidskému receptoru NPFF<sub>2</sub>

Vazba analogů PrRP31 a analogů PrRP20 k lidskému receptoru NPFF<sub>2</sub> byla zjišťována pomocí kompetitivních vazebných experimentů, které byly provedené na membránách buněk CHO-K1 s transfekovaným lidským receptorem NPFF<sub>2</sub>. Vazebné testy byly provedeny za optimálních podmínek uvedených v pracích [23, 69], buněčné membrány byly inkubovány s nezařazenými peptidy v rozmezí finálních koncentrací  $10^{-12}$  –  $10^{-4}$  M. Jako radioligand byl použit <sup>125</sup>I-1DMe, přičemž 1DMe je stabilní analog NPFF. Celková vazba představovala asi 5 % z celkové radioaktivity použité při experimentu (0,1 nM), nespecifická vazba tvořila asi 20 % vazby celkové.

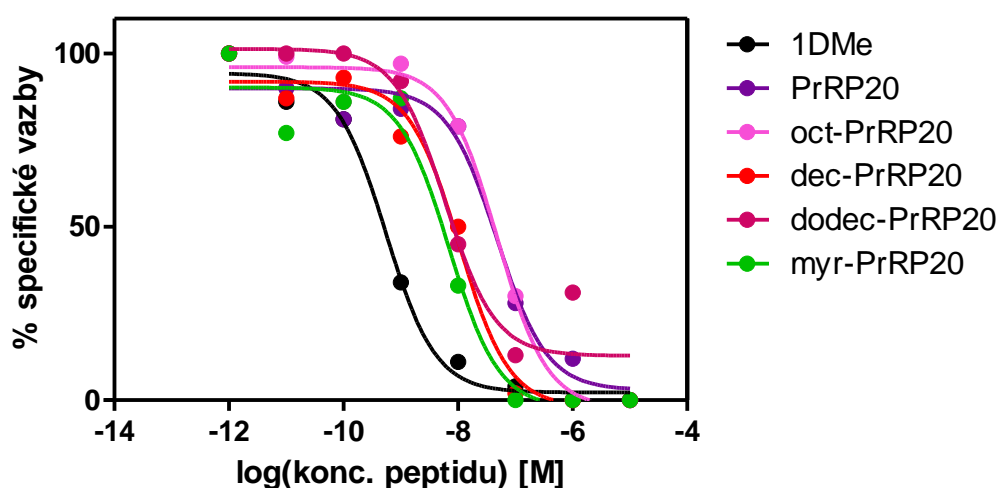
Všechny analogy PrRP31, kromě myr-PrRP31 a palm-PrRP31, se k receptoru NPFF<sub>2</sub> vázaly s vysokou afinitou srovnatelnou s afinitou nativního PrRP31 i PrRP20, které mají  $K_i$  v řádu  $10^{-8}$  M. Pro analogy myr-PrRP31 a palm-PrRP31 byla zjištěna hodnota  $K_i$  dokonce v řádu  $10^{-9}$  M, stejně tak pro všechny analogy PrRP20 s výjimkou oct-PrRP20, jehož afinita k receptoru NPFF<sub>2</sub> byla výrazně nižší,  $K_i$  v řádu  $10^{-7}$  M. K výpočtu  $K_i$  byla za  $K_d$  dosazena hodnota ze saturačních vazebných experimentů a to 0,72 nM [23, 69], radioligand <sup>125</sup>I-1DMe byl použit v koncentraci 0,1 nM. Zjištěné inhibiční konstanty pro jednotlivé peptidy jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6, str. 52). Na obrázku jsou znázorněny reprezentativní křivky vazebných experimentů (Obr. 9, str. 49).



A)



B)



**Obr. 9** Reprezentativní křivky A) PrRP31 a jeho analogů, B) PrRP20 a jeho analogů a 1DMe z kompetitivních vazebných experimentů na membránách buněk CHO-K1 s lidským receptorem NPFF<sub>2</sub>

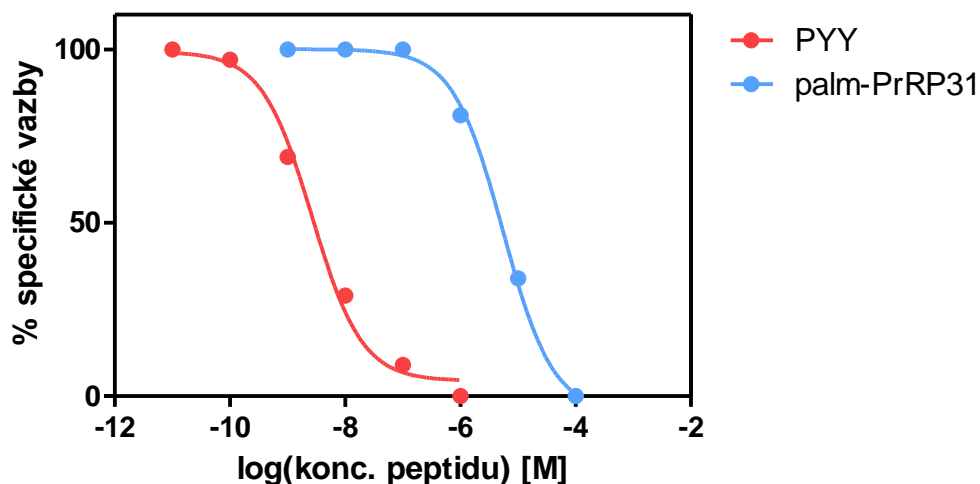
Inkubace probíhala 120 minut za pokojové teploty ve vazebném pufru 3 (složení viz kap. 3.2.2). Specifická vazba byla určena odečtením nespecifické vazby (vazba za přítomnosti 0,1 nM  $^{125}$ I-1DMe a  $10^{-5}$  M neznačeného peptidu), vyjádřena je v procentech, 100 % je vazba 0,1 nM  $^{125}$ I-1DMe za přítomnosti neznačeného peptidu v koncentraci  $10^{-12}$  M, příp.  $10^{-11}$  M.

#### 4.1.2.6 Vazba analogu palm-PrRP31 k receptoru Y5

Vazba analogu palm-PrRP31 k receptoru Y5 byla zjišťována pomocí kompetitivních vazebných experimentů na membránách buněk s lidským receptorem Y5. Analog palm-PrRP31 byl testován jako jediný ze studovaných analogů, jelikož se jednalo pouze o prvotní testy zjišťující možnost působení těchto látek přes receptor Y5. Právě tento analog byl vybrán z důvodu jeho ověřené dobré vazby jak k buňkám RC-4B/C, tak k receptoru GPR10 i k receptoru NPFF<sub>2</sub>. Jelikož z prvotních testů bylo zřejmé, že palm-PrRP31 nevykazoval silnou vazbu k tomuto receptoru, nebyly podmínky plně optimalizovány (nespecifická vazba byla větší než 50 % vazby celkové) a nebyly provedeny saturační vazebné experimenty, tudíž nemohla být spočítána  $K_i$  a data jsou uvedena jako  $IC_{50}$ . Zároveň byla měření s palm-PrRP31 provedena pouze dvakrát (z důvodu nedostatku membrán po dlouhé optimalizaci podmínek), uvedené výsledky jsou proto pouze přibližné.

Vazebné testy byly prováděné za podmínek popsaných v kapitole 3.2.2.4. Vazba palm-PrRP31 byla porovnána s vazbou přirozeného ligandu receptoru Y5, kterým je peptid YY (PYY). Buněčné membrány byly inkubovány s peptidy v rozmezí finálních koncentrací  $10^{-11} - 10^{-6}$  M (PYY) nebo  $10^{-9} - 10^{-4}$  M (palm-PrRP31) a 0,1 nM  $^{125}$ I-PYY.

Bylo zjištěno, že palm-PrRP31 se k receptoru Y5 váže s výrazně nižší afinitou než jeho endogenní ligand PYY, kdy  $IC_{50}$  byla v řádu  $10^{-6}$  M. Hodnota  $IC_{50}$  pro PYY je uvedena v tabulce shrnující všechny vazebné experimenty (Tab. 6, str. 52). Reprezentativní křivky z těchto testů jsou ukázány na obrázku (Obr. 10, str. 51).



**Obr. 10 Reprezentativní křivky PYY a palm-PrRP31 z kompetitivních vazebných experimentů na membránách buněk HEK293T s lidským receptorem Y5**

Inkubace probíhala 120 minut za pokojové teploty ve vazebném pufru 4 (složení viz kap. 3.2.2). Specifická vazba byla určena odečtením nespecifické vazby (vazba za přítomnosti 0,1 nM  $^{125}$ I-PYY a  $10^{-6}$  M PYY, resp.  $10^{-4}$  M neznačeného peptidu), vyjádřena je v procentech, 100 % představuje vazba 0,1 nM  $^{125}$ I-PrRP31 za přítomnosti neznačeného peptidu v koncentraci  $10^{-11}$  M, příp.  $10^{-9}$  M.

#### 4.1.2.7 Shrnutí výsledků kompetitivních vazebných experimentů

V následující tabulce (Tab. 6, str. 52) jsou shrnuty výsledky všech výše uvedených kompetitivních vazebných experimentů. V tabulce lze vidět srovnání těchto výsledků, především posun v hodnotě  $K_i$  u analogů s navázanou mastnou kyselinou při jejich vazbě k hypofyzární buněčné linii RC-4B/C, ke kterému nedochází (s výjimkou myr-PrRP31) u vazby k lidskému receptoru GPR10. U vazby k lidskému receptoru NPFF<sub>2</sub> také není přímý rozdíl mezi analogy s navázanou mastnou kyselinou nebo bez ní, ale s rostoucí délkou mastné kyseliny se snižuje hodnota  $K_i$  analogů PrRP31, avšak analog stear-PrRP31 má opět již  $K_i$  vyšší, tudíž delší mastná kyselina (až po kyselinu stearovou) by mohla mít za následek vyšší afinitu analogu k receptoru NPFF<sub>2</sub>. Analog palm-PrRP31 má dokonce  $K_i$  nižší než stabilní analog NPFF – 1DMe. Také analogy PrRP20 s navázanou mastnou kyselinou vykazují vyšší afinitu k receptoru NPFF<sub>2</sub> než nativní PrRP20, jediný oct-PrRP20 má k tomuto receptoru ve srovnání s nativním PrRP20 afinitu sniženou.

Testované analogy vykazují vysokou afinitu pro vazbu jak k buněčné linii RC-4B/C, tak k receptorům GPR10 a NPFF<sub>2</sub>. Naopak k receptoru Y5 se jediný testovaný analog palm-PrRP31 vázal s velice nízkou afinitou.

**Tab. 6** Konstanty  $K_i$  získané z kompetitivních vazebných experimentů PrRP a jeho analogů k hypofyzární buněčné linii RC-4/C, lidskému receptoru GPR10 a lidskému receptoru NPFF<sub>2</sub> nebo konstanty  $IC_{50}$  vazby palm-PrRP31 a PYY k receptoru Y5

Data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  S.E.M., naměřené hodnoty byly nejprve vyhodnoceny Grubbsovým testem pro vyloučení odlehlých výsledků

| Analog       | RC-4B/C<br><sup>125</sup> I-rPrRP31<br>$K_i$ [nM] | Lidský GPR10<br><sup>125</sup> I-hPrRP31<br>$K_i$ [nM] | Lidský NPFF <sub>2</sub><br><sup>125</sup> I-1DMe<br>$K_i$ [nM] | Lidský Y5<br><sup>125</sup> I-PYY<br>$IC_{50}$ [nM] |
|--------------|---|--|---|---|
| rPrRP31      | 2,41 $\pm$ 0,11                                   | 3,91 $\pm$ 0,21  | 42,2 $\pm$ 6,76   | -   |
| Nle-PrRP31   | 1,28 $\pm$ 0,20                                   | 1,87 $\pm$ 0,42  | 49,6 $\pm$ 3,37   | -   |
| oct-PrRP31   | 0,98 $\pm$ 0,22                                   | 1,49 $\pm$ 0,07  | 24,8 $\pm$ 13,2   | -   |
| dec-PrRP31   | 0,68 $\pm$ 0,12                                   | 1,42 $\pm$ 0,55  | 14,7 $\pm$ 3,10   | -   |
| dodec-PrRP31 | 0,38 $\pm$ 0,14                                   | 1,15 $\pm$ 0,35  | 14,2 $\pm$ 6,40   | -   |
| myr-PrRP31   | 0,69 $\pm$ 0,09                                   | 0,69 $\pm$ 0,09  | 1,59 $\pm$ 0,32   | -   |
| palm-PrRP31  | 0,51 $\pm$ 0,15                                   | 2,94 $\pm$ 0,33  | 0,69 $\pm$ 0,36   | $\approx$ 1000                                      |
| stear-PrRP31 | 0,93 $\pm$ 0,08                                   | 5,24 $\pm$ 0,57  | 15,9 $\pm$ 14,4   | -   |
| rPrRP20      | 2,23 $\pm$ 0,19                                   | 4,40 $\pm$ 0,77  | 21,8 $\pm$ 9,91   | -   |
| oct-PrRP20   | 0,91 $\pm$ 0,23                                   | 1,88 $\pm$ 0,31  | 175 $\pm$ 133   | -   |
| dec-PrRP20   | 0,41 $\pm$ 0,01                                   | 2,94 $\pm$ 0,47  | 3,60 $\pm$ 2,57   | -   |
| dodec-PrRP20 | 0,58 $\pm$ 0,22                                   | 2,34 $\pm$ 0,25  | 9,97 $\pm$ 3,48   | -   |
| myr-PrRP20   | 1,02 $\pm$ 0,20                                   | 4,21 $\pm$ 0,24  | 8,23 $\pm$ 1,97   | -   |
| 1DMe         | -   | -  | 2,21 $\pm$ 0,70   | -   |
| PYY          | -   | -  | -   | 3,03 $\pm$ 0,62                                     |

#### 4.1.3 Spouštění signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 po působení analogů PrRP u buněčné linie CHO-K1 s lidským receptorem GPR10

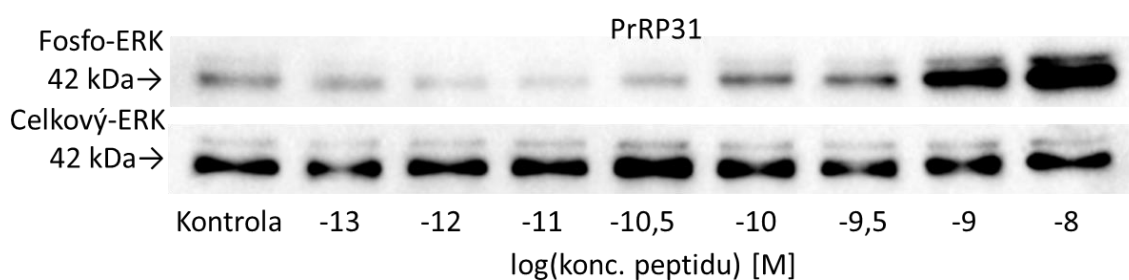
Pro sběr buněk na stanovení fosforylace MAPK/ERK1/2 do buněk CHO-K1 s receptorem GPR10 byly buňky pěstovány na 24jamkových destičkách do celkového počtu přibližně 100 tisíc buněk/jamku za podmínek popsaných v kap. 3.2.3.1. Spouštění této signalizační dráhy bylo testováno pouze u PrRP31, PrRP20 a jejich analogů palm-PrRP31 a myr-PrRP20, jelikož měly v testech *in vivo* nejlepší účinky na příjem potravy.

Bylo zjištěno, že všechny testované analogy spouští signalizační dráhu s prokazatelnou koncentrační závislostí, jak je znázorněno na obrázku (Obr. 12, str. 55). Hodnoty naměřených  $EC_{50}$  se pro jednotlivé analogy příliš nelišily, všechny byly v řádu  $10^{-9}$  M, jediný PrRP31 měl  $EC_{50}$  o něco menší než zbylé tři analogy,  $EC_{50}$  v řádu  $10^{-10}$  M. Tímto bylo prokázáno, že všechny testované analogy jsou agonisty receptoru GPR10. Zjištěné  $EC_{50}$  jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7). Pro vyhodnocení byly hodnoty fosforylace ERK vztaženy na množství aktinu ve vzorku. Stanovení celkového ERK potvrdilo, že se ho ve vzorcích nacházelo srovnatelné množství. Reprezentativní membrány pro kvantifikaci fosforylovaného a celkového ERK jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 11, str. 54).

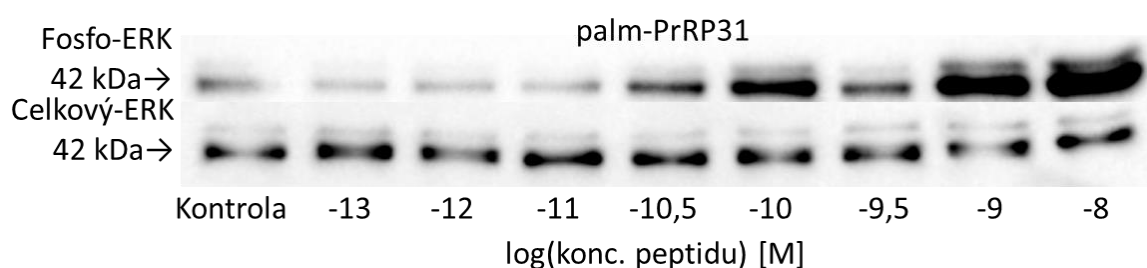
**Tab. 7 Konstanty  $EC_{50}$  získané z testování spouštění signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 v závislosti na koncentraci analogu**

| Analog      | $EC_{50}$ [nM]  |
|-------------|-----------------|
| PrRP31      | $0,77 \pm 0,23$ |
| palm-PrRP31 | $1,11 \pm 0,54$ |
| PrRP20      | $2,58 \pm 0,97$ |
| myr-PrRP20  | $2,52 \pm 1,09$ |

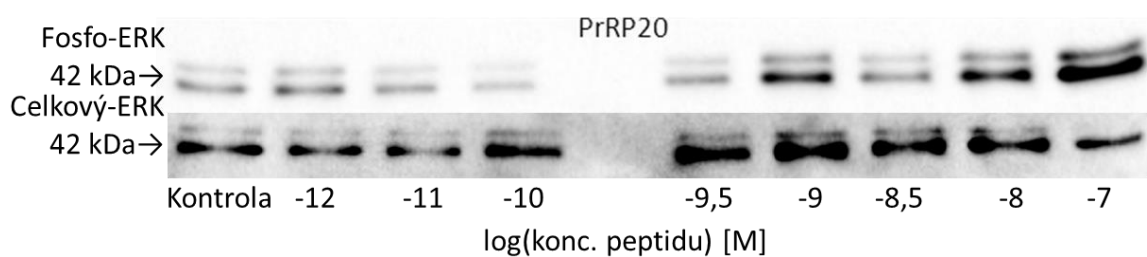
A)



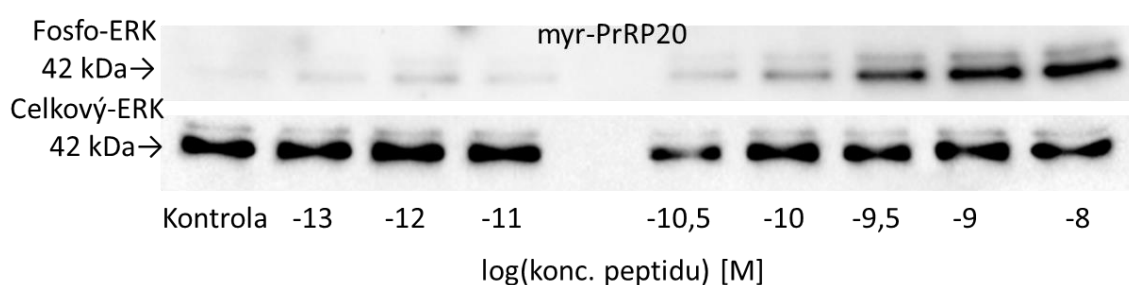
B)



C)

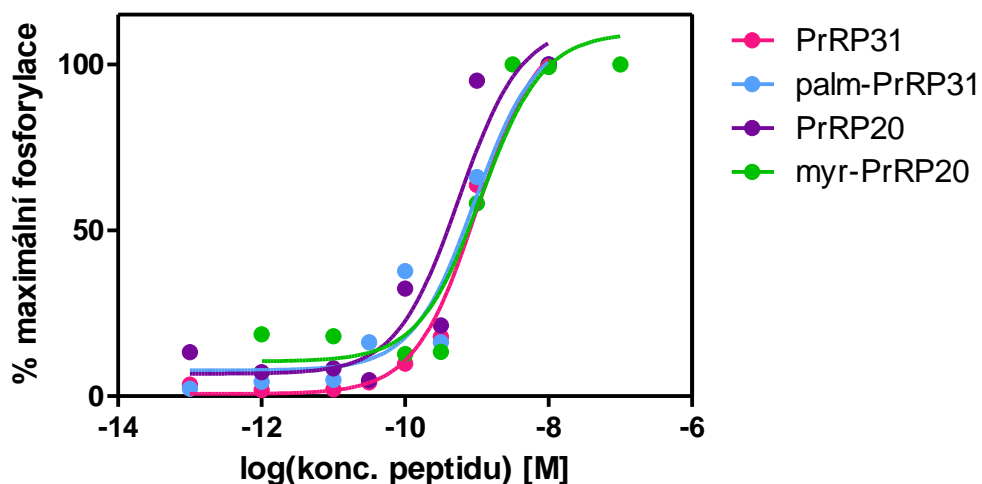


D)



**Obr. 11 Reprezentativní membrány využité pro kvantifikaci fosforylovaného a celkového ERK v buňkách CHO-K1 s lidským receptorem GPR10 po působení peptidů A) PrRP31, B) palm-PrRP31, C) PrRP20 a D) myr-PrRP20**

Buňky byly s peptidy ve finálních koncentracích uvedených na obrázcích inkubovány při 37°C po dobu 5 minut. Jako kontrola je označen vzorek z buněk, na které nebyl aplikován žádný peptid.



**Obr. 12** Reprezentativní křivky znázorňující závislost fosforylace ERK na koncentraci peptidu

Buňky CHO-K1 s receptorem GPR10 byly stimulovány peptidy PrRP31, palm-PrRP31, PrRP20 a myr-PrRP20 ve finálních koncentracích  $10^{-13}$  až  $10^{-8}$  M (PrRP31, palm-PrRP31, PrRP20) nebo  $10^{-12}$  až  $10^{-7}$  M (myr-PrRP20) po dobu 5 minut při 37°C. Následná lyzace, elektroforéza a přenos buněk na membránu probíhaly podle postupu uvedeného v kap. 3.2.3. Jako 100 % je určena hodnota fosforylace po působení peptidu ve finální koncentraci  $10^{-8}$  M (PrRP31, palm-PrRP31, PrRP20) nebo  $10^{-7}$  M (myr-PrRP20). Všechny hodnoty jsou uvedeny jako poměr fosforylovaného ERK a aktinu.

## 4.2 POKUSY *IN VIVO*

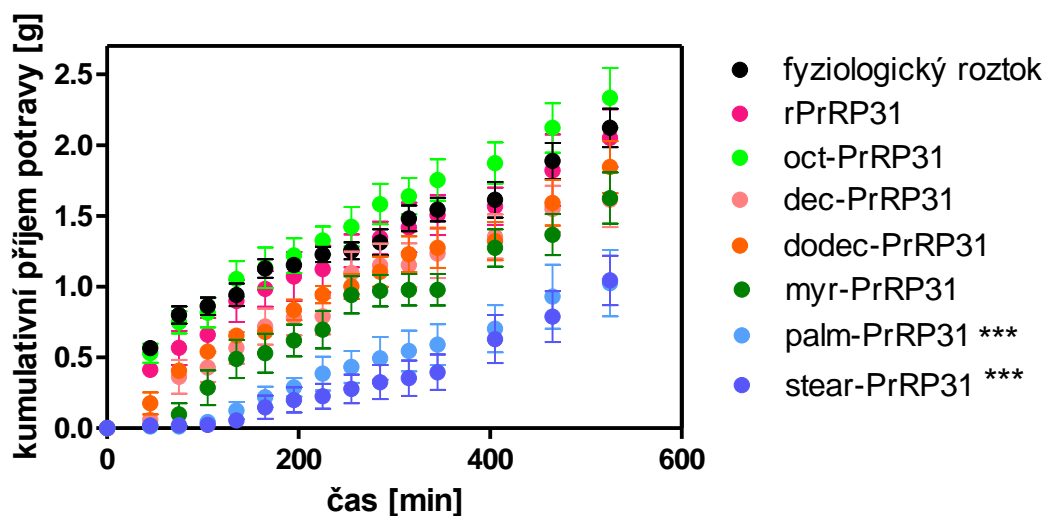
### 4.2.1 Ovlivnění příjmu potravy po SC podání PrRP31 a jeho analogů

Byly sledovány změny v příjmu potravy u samců kmene C57Bl/6 po SC podání jednotlivých peptidů. Byly porovnávány účinky jednotlivých peptidů po podání dávky 5 mg/kg hladovým samcům a dále byla testována závislost účinku na dávce při podání palm-PrRP31 a myr-PrRP20, a to v dávkách 1 mg/kg a 5 mg/kg. Jako kontrola byli vzati myši samci, kterým byl podán fyziologický roztok. Každá skupina obsahovala minimálně 6 myši a každý analog byl testován nejméně dvakrát. Změny v kumulativním příjmu potravy byly pozorovány po dobu nejméně 6 hodin.

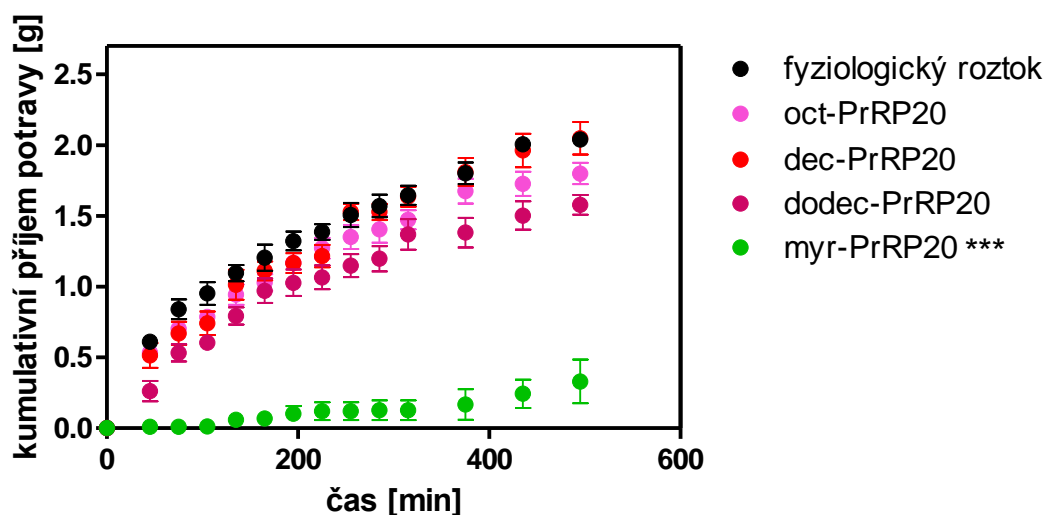
Aplikace analogů oct-PrRP31, dec-PrRP31, dodec-PrRP31, oct-PrRP20, dec-PrRP20, dodec-PrRP20 a myr-PrRP31 neměla za následek snížení příjmu potravy. V porovnání s účinky fyziologického roztoku byly signifikantní výsledky myr-PrRP20, palm-PrRP31 a stear-PrRP31 ( $^{***}P < 0,001$ ), všechny měly za následek výrazné snížení příjmu potravy. Palm-PrRP31 způsobil srovnatelnou změnu v příjmu potravy po podání v obou dávkách, u myr-PrRP20 byl efekt výrazně větší při podání dávky 5 mg/kg. Grafy kumulativního příjmu potravy v závislosti na čase i na dávce jsou zobrazeny na obrázcích (Obr. 13, str. 57; Obr. 14, str. 58 a Obr. 15, str. 59).



A)



B)

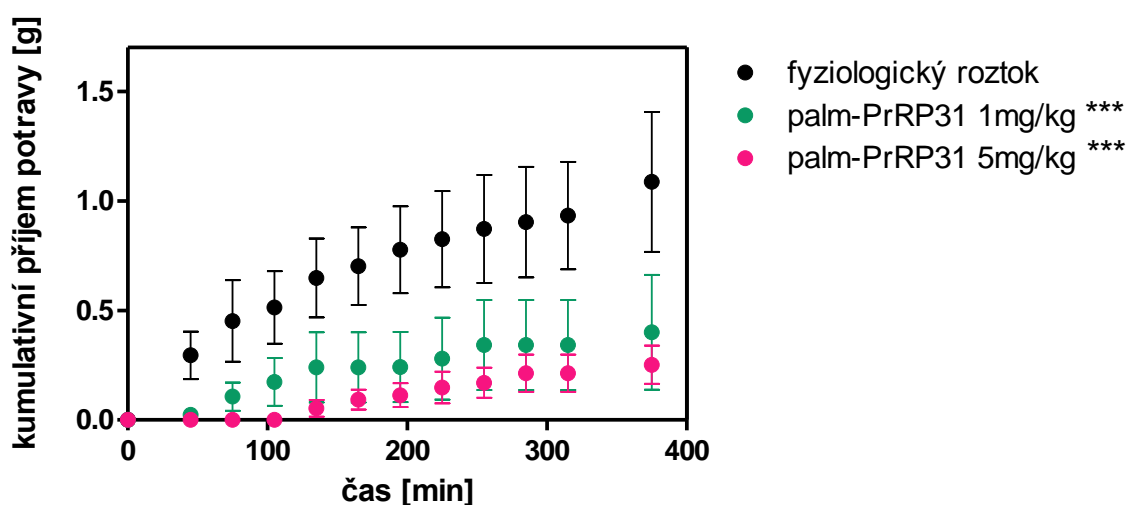


**Obr. 13 Kumulativní příjem potravy hladových samců kmene C57Bl/6 po SC podání**

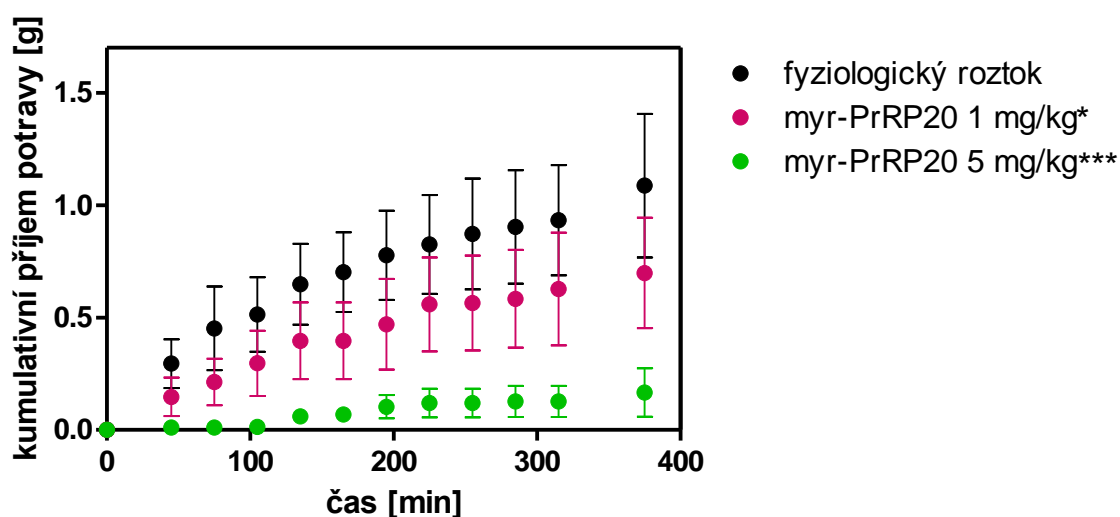
**A) analogů PrRP31 a B) analogů PrRP20 v závislosti na čase**

Peptidy byly podány SC v dávce 5 mg/kg, kontrolním jedincům byl podán pouze fyziologický roztok. K vyhodnocení dat bylo využito statistické metody jednocestná ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem ( $n=6-8$ ). Zobrazená data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  S.E.M. Jako signifikantní jsou označeny výsledky, kdy  $*** P < 0,001$  ve srovnání se skupinou injikovanou fyziologickým roztokem.

A)



B)



**Obr. 14 Kumulativní příjem potravy hladových samců kmene C57Bl/6 po SC podání**

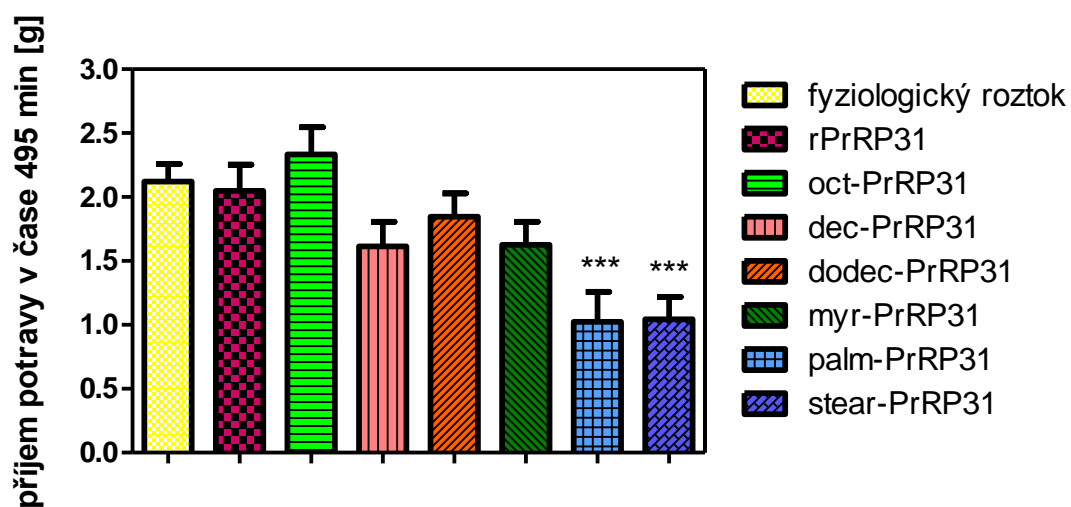
**A) palm-PrRP31 a B) myr-PrRP20 v dávkách 1 nebo 5 mg/kg v závislosti na čase**

Peptidy byly podány SC, kontrolním jedincům byl podán pouze fyziologický roztok.

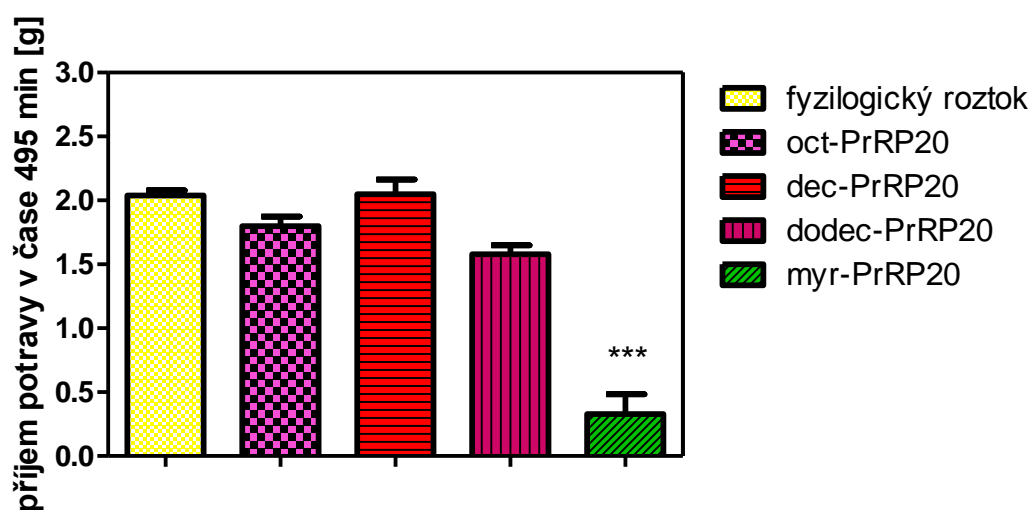
K vyhodnocení dat bylo využito statistické metody jednocestná ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem ( $n=6-8$ ). Zobrazená data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  S.E.M.

Jako signifikantní jsou označeny výsledky, kdy \*  $P < 0,05$  a \*\*\*  $P < 0,001$  ve srovnání se skupinou injikovanou fyziologickým roztokem.

A)



B)



**Obr. 15** Příjem potravy hladových myších samců kmene C57Bl/6 po SC podání

**A) analogů PrRP31 a B) analogů PrRP20 v čase 495 minut**

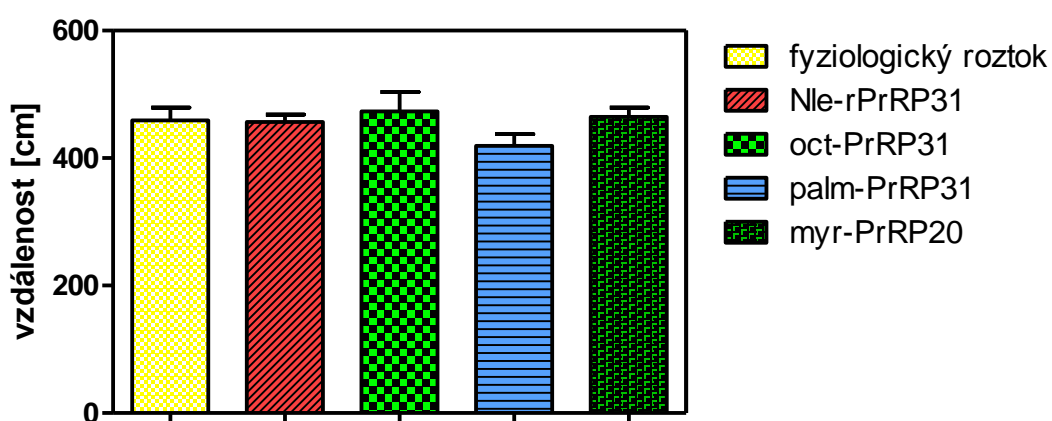
Peptidy byly podány SC v dávce 5 mg/kg. K vyhodnocení dat bylo využito statistické metody jednocestná ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem ( $n=6-8$ ).

Zobrazená data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  S.E.M. Jako signifikantní jsou označeny

výsledky, kdy \*\*\*  $P < 0,001$ .

#### 4.2.2 Sedativní účinky analogů PrRP

Sedativní účinky peptidů byly měřeny po jejich SC podání testem v otevřeném poli (viz kap. 3.3.3). Myším byly SC podány peptidy v dávce 5 mg/kg. Test byl zahájen po uplynutí 15 minut po podání, zaznamenávána byla vzdálenost, kterou myši urazily ve sledovaném uzavřeném prostoru za dobu 10 minut. Z naměřených dat bylo zjištěno, že žádná z látek tyto účinky nezpůsobuje, výsledky nebyly vzhledem ke kontrole signifikantní. Kontrola byly myši, kterým byl podán jen fyziologický roztok. Graf porovnávající naměřené výsledky je uveden na obrázku (Obr. 16).



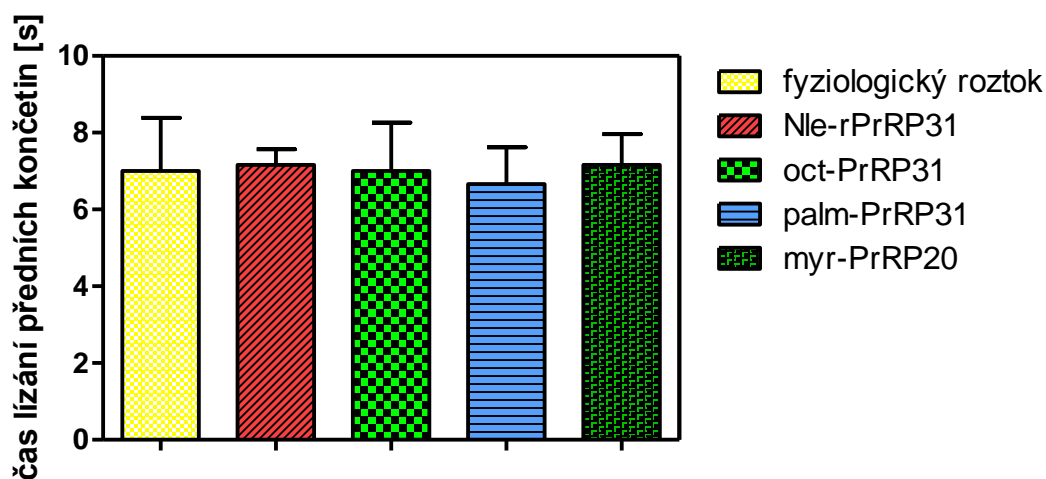
**Obr. 16 Účinky testovaných peptidů na sedaci v testu v otevřeném poli**

*Peptidy byly podány SC v dávce 5 mg/kg, byla měřena vzdálenost, jakou myši naběhali za dobu 10 minut. Data byla vyhodnocena metodou jednocestná ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (n=6). Vzhledem ke kontrole byly změny způsobené podáním všech peptidů nesignifikantní. Kontrolu představovaly myši, kterým byl podán pouze fyziologický roztok.*

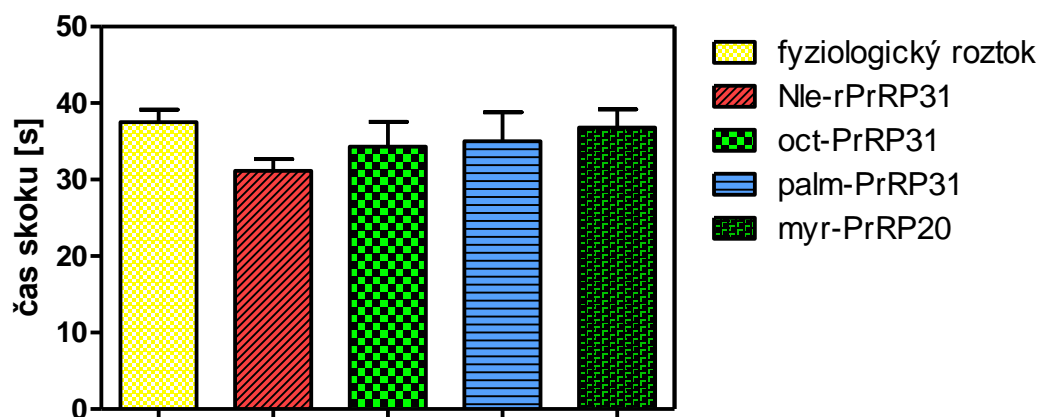
#### 4.2.3 Analgetické účinky analogů PrRP

Analgetické účinky peptidů byly zjišťovány pomocí testu na horké plotně (53°C). Zaznamenáván byl čas, kdy si myš po vložení na horkou plotnu začala lízat přední končetiny a kdy poté v reakci na bolest vyvolanou horkou plotnou vyskočila. Ani v jedné hodnotě nebyly ani výrazné, ani signifikantní změny po působení peptidů vůči kontrole (fyziologický roztok). Grafy porovnávající zjištěné výsledky jsou na obrázku (Obr. 17, str. 61).

A)



B)



**Obr. 17 Porovnání výsledků testu na horké plotně po SC podání analogů PrRP**

Peptidy byly SC podány v dávce 5 mg/kg, měřen byl čas, kdy si myš začala lízat přední končetiny a kdy vyskočila v odpovědi na bolest působenou horkou plotnou (53°C).

K vyhodnocení dat byla použita metoda jednocestná ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem (n=6). Žádný z výsledků nebyl v porovnání s kontrolou (jedinci injikovaní fyziologickým roztokem) signifikantní.

## 5 DISKUSE

---

Příjem potravy a udržování energetické rovnováhy jsou děje, jejichž regulace představuje velice složitý a komplexní systém zahrnující celou řadu metabolických procesů. Hlavním centrem, které se účastní regulace těchto dějů, je hypothalamus, do něhož míří anorexigenní hormony z periferie (leptin, insulin, pankreatický polypeptid, peptid YY) a jediný doposud známý orexigenní hormon vylučovaný v periférii ghrelin a odkud jsou vysílány orexigenní i anorexigenní signály do dalších částí CNS, především do NTS v mozkovém kmeni, kde jsou vyhodnoceny společně se signály z periferie [3].

Jedním z peptidů účastnících se regulace příjmu potravy je peptid uvolňující prolaktin. Tento peptid byl původně spojován s vylučováním prolaktinu [26], avšak tento účinek byl brzy zpochybněn [41]. Jelikož byla mRNA pro tento peptid objevena v hypothalamických centrech důležitých pro energetickou rovnováhu, začal být zjišťován vliv PrRP na příjem potravy [42], jeho anorexigenní působení bylo následně potvrzeno několika studiemi [57, 58, 60].

Tato práce zkoumala účinky nových analogů PrRP20 a PrRP31 s různě dlouhými mastnými kyselinami navázanými na jejich N-konec v *in vitro* experimentech na buňkách RC-4B/C spontánně exprimujícími GPR10, CHO-K1 s tranfekovaným lidským receptorem GPR10 a na buněčných membránách s lidským receptorem NPFF<sub>2</sub> nebo Y5 a dále v *in vivo* experimentech na samcích myší kmene C57Bl/6. Objasnění, které receptory se účastní realizace signálu PrRP a nalezení analogu PrRP se zvýšenou stabilitou a *in vivo* centrální účinností po periferním podání, by mohlo vést k velkému pokroku v hledání účinného léku proti obezitě.

### 5.1 NOVÉ ANALOGY PrRP

Neuropeptidy regulující příjem potravy, které vznikají a působí v CNS, jsou vhodnými kandidáty pro eventuální antiobezitní intervence. Jejich možnosti využití jsou však komplikovány faktem, že se snadno degradují, a dále pak, že jsou neúčinné po periferním podání, protože nejsou schopny projít hematoencefalickou bariérou. Jednou z možností, jak tyto problémy překonat, je lipidizace peptidů. Příkladem takového přirozeného lipopeptidu, který vzniká v periférii a působí v hypothalamu, je ghrelin, který díky kyselině

oktanové připojené esterovou vazbou k Ser<sup>3</sup> prochází pravděpodobně pasivním transportem přes hematoencefalickou bariéru [76]. Lipidizací vznikl analog GLP-1 liraglutid, který je komerčně využíván pro léčbu diabetu. Stabilita lipopeptidů v organismu je prodloužená v důsledku vazby na sérové proteiny [67]. V této studii bylo pro navržené analogy PrRP využito lipidizace.

Již dříve bylo zjištěno, že pro zachování vazby na receptor a udržení biologické aktivity je nezbytný C-konec peptidu [37, 63], proto byl u nových analogů modifikován pouze N-konec. Byly syntetizovány analogy PrRP31, ale i od jeho kratší formy, PrRP20, jehož afinita k receptoru GPR10 byla v *in vitro* experimentech srovnatelná s afinitou PrRP31 [64, 77]. Pro zvýšení stability peptidů byl u analogů PrRP31 nahrazen Met<sup>24</sup> norleucinem (Nle), dále byly na N-konce peptidů navázány amidovou vazbou mastné kyseliny, a to kys. octová, dekanová, dodekanová, myristová, palmitová a stearová. Mastné kyseliny byly navázány amidovou vazbou, jelikož je na rozdíl od vazby esterové stabilní.

U analogů GLP-1 bylo zjištěno, že délka navázané mastné kyseliny negativně ovlivňuje vazbu k receptoru pouze, pokud je delší než 16 uhlíků, avšak s rostoucí délkou mastné kyseliny se výrazně zvyšuje doba setrvání léčiva v organismu [78].

## 5.2 IN VITRO EXPERIMENTY

K provedení *in vitro* pokusů byla zvolena potkaní hypofyzární buněčná linie RC-4B/C, u které byl prokázán přirozený výskyt jak receptoru GPR10 (v řádu deseti tisíců vazebných míst na buňku [64]), tak receptoru NPFF<sub>2</sub> [23, 69], dále buněčná linie CHO-K1 s transfekovaným lidským receptorem GPR10 a buněčné membrány z buněk obsahujících lidský receptor NPFF<sub>2</sub> nebo Y5. Receptor NPFF<sub>2</sub> byl pro vazebné experimenty vybrán, jelikož již bylo prokázáno, že se k němu PrRP váže s vysokou afinitou [22, 69], vazba k receptoru Y5 byla testována z důvodu známé vysoké homologie tohoto receptoru s receptorem GPR10 [34, 35]. Pro zjišťování spouštění signální dráhy v závislosti na koncentraci peptidu byly využity buňky CHO-K1 s receptorem GPR10, které jsou vhodnější než buňky RC-4B/C, jelikož neobsahují další receptory, s kterými by mohl PrRP interagovat (např. receptor NPFF<sub>2</sub>).

Vazba testovaných analogů k buňkám RC-4B/C a receptorům GPR10, NPFF<sub>2</sub> a Y5 byla charakterizována pomocí kompetitivních vazebných testů. Optimální podmínky pro vazbu PrRP31 k buněčné linii RC-4B/C již byly v naší skupině publikovány, je to inkubace ve vazebném pufru 20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA, 2 g/l glukosa a 0,1 mg/ml BPTI pro zabránění proteolýzy peptidů, inkubace probíhala při pokojové teplotě po dobu 60 minut [64].

Vazebné testy na membránách buněk obsahujících receptor NPFF<sub>2</sub> byly provedeny podle pokynů výrobce, což bylo inkubace ve vazebném pufru 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 60 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mg/ml BSA při pokojové teplotě po dobu 120 minut.

Podmínky pro vazbu k receptoru GPR10 byly zjišťovány v této práci, byla to inkubace za pokojové teploty po dobu 60 minut ve vazebném pufru 25 mM Hepes pH 7,4, 118 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5% BSA a 2 g/l glukosa.

Vazebné experimenty s buňkami obsahujícími lidský receptor Y5 byly provedeny za inkubace při pokojové teplotě po dobu 90 minut ve vazebném pufru 25 mM Hepes pH 7,4, 118 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4,7 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5% BSA a 1 mg/ml bacitracin.

Specifická vazba <sup>125</sup>I-PrRP31 k receptoru GPR10 byla zjišťována pomocí saturačních vazebných experimentů. Bylo zjištěno, že PrRP31 se k receptoru GPR10 váže s vysokou afinitou a nízkou nescifickou vazbou. V publikovaných studiích se uvádí  $K_d$  v řádu 10<sup>-11</sup> M [26], případně 10<sup>-9</sup> M [37] na membránách buněk CHO s receptorem GPR10. V této práci byla zjištěna  $K_d$  1,05 nM, což odpovídá jednomu z již publikovaných výsledků,  $K_d$  v řádu nM je navíc typická pro vazbu endogenních ligandů ke svým receptorům [72].

Využitím kompetitivních vazebných experimentů byla charakterizována afinita nově navržených analogů jak PrRP31, tak PrRP20 k buňkách RC-4B/C a k receptorům GPR10, NPFF<sub>2</sub> a Y5. Bylo zjištěno, že všechny analogy mají vysokou afinitu k buňkám RC-4B/C, analogy s navázanou mastnou kyselinou (kromě myr-PrRP20) mají  $K_i$  dokonce v řádu 10<sup>-10</sup> M, zatímco PrRP31, Nle-PrRP31, PrRP20 a myr-PrRP20 se k těmto buňkám vážou s  $K_i$  o řád vyšší (tj. 10<sup>-9</sup> M), což u PrRP31 a PrRP20 odpovídá již dříve zjištěným výsledkům [23, 64, 69]. To by mohlo znamenat, že navázání mastné kyseliny zvyšuje afinitu vazby peptidů k buněčné linii RC-4B/C. Dále byla testována vazba analogů k receptoru GPR10. Zde byla zjištěna  $K_i$  pro PrRP31 i PrRP20 řádově 10<sup>-9</sup> M, což je opět v souladu s již



publikovanými výsledky [37]. Stejnou  $K_i$  vykazovaly i ostatní analogy, což ukazuje, že zvýšení afinity vazby k buňkám RC-4B/C nejspíš není způsobeno zvýšením afinity těchto látek k receptoru GPR10. Dále byla testována vazba analogů PrRP k receptoru NPFF<sub>2</sub>, výsledky získané pro 1DMe, PrRP20 a PrRP31 odpovídaly publikovaným hodnotám pro nativní PrRP [22]. Analogy Nle-PrRP31, oct-PrRP31, dec-PrRP31, dodec-PrRP31 a stear-PrRP31 měly  $K_i$  srovnatelnou s PrRP31 a PrRP20, tedy v řádu  $10^{-8}$  M, analogy myr-PrRP31, palm-PrRP20, dec-PrRP10, dodec-PrRP20 a myr-PrRP20 měly  $K_i$  srovnatelnou dokonce s 1DMe, řádově  $10^{-9}$  M. Tento fakt potvrzuje, že receptor NPFF<sub>2</sub> by mohl hrát důležitou roli v působení těchto peptidů. Dalším testovaným receptorem byl lidský receptor Y5, avšak z prvotních výsledků bylo zřejmé, že afinita testovaných analogů k tomuto receptoru není tak silná, aby mohly tyto receptory hrát za fyziologických podmínek výraznější roli v realizaci signálu PrRP, proto tato vazba nebyla dále testována.

Dále byla testována závislost spouštění signalizační dráhy MAPK/ERK1/2 na koncentraci peptidu. U této signalizační dráhy bylo zjištěno, že se účastní iniciace translace genu pro prolaktin [70]. Prokázání fosforylace ERK bylo provedeno detekcí pomocí protilátek poté, co byly proteiny z elektroforetických gelů přeneseny na membránu. Všechny testované analogy spouštěly signalizační dráhu ERK a u všech byla také zjištěna koncentrační závislost míry fosforylace ERK. Všechny testované látky jsou tedy agonisté. U PrRP31 byla zjištěna  $EC_{50}$  v řádu  $10^{-10}$  M, ostatní peptidy spouštěly signalizační dráhu s  $EC_{50}$  v řádu  $10^{-9}$  M.

Lze tedy shrnout, že lipidizace obou základních peptidů, PrRP31 a PrRP20, nejen že nesnížila vazbu na receptor GPR10, ale afinita k receptorům buněčné linie RC-4B/C se zvýšila. Všechny analogy tedy byly dále testovány v *in vivo* experimentech.

### 5.3 *IN VIVO* EXPERIMENTY

Pro testování biologických účinků *in vivo* byla zvolena metoda testování příjmu potravy po akutním podání analogů PrRP hladovým myším s cílem určit, zda zavedení mastné kyseliny umožní centrální působení látek po jejich periferním podání. Centrální působení je pro látky regulující příjem potravy nezbytné.

PrRP byl navržen jako možný anorexigenní faktor na základě jeho výskytu v částech mozku zahrnutých v regulaci energetické rovnováhy (PVN, DMN) a také ze zjištění,

že množství jeho mRNA je sníženo v době, kdy se organismus nachází ve stavu negativní energetické bilance, jakým je např. hladovění nebo kojení [42]. Dále bylo v mnoha studiích zjištěno, že ICV podání PrRP vede ke snížení příjmu potravy jak u myší, tak u potkanů [59, 60, 79], avšak tento efekt byl pouze krátkodobý [64]. Bylo také prokázáno, že periferní podání PrRP nemá žádný účinek na příjem potravy [64]. Dalším potvrzením důležitosti systému GPR10-PrRP v regulaci příjmu potravy bylo zjištění, že vyřazení genu jak pro PrRP tak pro GPR10 má v dospělosti u myší za následek obezitu, sníženou glukosovou toleranci, u PrRP-deficientních myší byla navíc zjištěna insulinová rezistence. U obou typů myší byla také porušena CCK signalizace, což dokazuje, že systém GPR10-PrRP by se mohl účastnit přenosu signálu CCK, který po příjmu potravy navozuje pocit sytosti [60, 80, 81].

Účinky zkoumaných analogů na příjem potravy byly testovány na hladových samcích myší kmene C57Bl/6, kterým bylo SC podáno 5 mg/kg daného peptidu. Bylo potvrzeno předchozí zjištění, že přirozený nemodifikovaný PrRP31 po periferním podání nemá vliv na příjem potravy. Žádný účinek na příjem potravy nevykazovaly ani analogy s kratšími mastnými kyselinami oct-PrRP31, dec-PrRP31, dodec-PrRP31, myr-PrRP31, oct-PrRP20, dec-PrRP20 a dodec-PrRP20, v kumulativním příjmu potravy nevykazovaly žádnou signifikantní změnu oproti myším, kterým byl podán fyziologický roztok. Naopak výrazné signifikantní a dlouhotrvající snížení příjmu potravy bylo pozorováno po podání palm-PrRP31, stear-PrRP31 a myr-PrRP20. Tyto výsledky naznačují, že navázání mastné kyseliny delší než 14 uhlíků by mohlo vést k překonání hematoencefalické bariéry těmito lipidovanými analogy PrRP, což má za následek snížení příjmu potravy i po periferním podání peptidů. Centrální efekt byl pozorován také u lipidovaných analogů neuropeptidů: NPY, neurotensinu a galaninu, kdy navázání kyseliny palmitové způsobilo kromě zvýšené biodostupnosti a odolnosti k proteolytickým enzymům také centrální účinky vedoucí k potlačení epileptických záchvatů u myší i po periferním podání [82]. Pravděpodobný přechod přes hematoencefalickou bariéru způsobený navázáním mastné kyseliny byl pozorován u liraglutidu, analogu GLP-1, který má amidovou vazbou navázanou kyselinu palmitovou a působí jak na sekreci insulinu, tak na snížení příjmu potravy [67]. Zlepšení biologického účinku po navázání mastné kyseliny (myristové, palmitové nebo stearové) bylo zjištěno také u analogů gastrointestinálního inhibičního peptidu (GIP; *Gastric*

*inhibitory polypeptide*), kdy N-koncová acetylace vedla také k prodloužení pozorovaného účinku na sekreci insulinu u myší [83]. Prodloužený biologický účinek na příjem potravy u myší byl pozorován také u pankreatického polypeptidu s navázanou palmitovou kyselinou [84]. Všechny tyto lipopeptidy měly prodlouženou stabilitu v organismu v důsledku vazby na sérový albumin.

Testované lipopeptidy neměly vliv na sedaci a analgezii, které bývají doprovodnými účinky vlivu na příjem potravy. Výsledky testu pohybu v otevřeném poli ani analgetického testu na horké plotně nebyly signifikantní, nebyla pozorována žádná výrazná změna v chování oproti myším, kterým byl podán pouze fyziologický roztok. Ačkoli bylo publikováno, že PrRP má po ICV podání analgetické účinky [56], ze zjištěných výsledků je možné usuzovat, že jsou spojeny právě s ICV podáním a po SC podání se peptid nedostane do částí mozku účastnících se odpovědi organismu na bolest.

Je tedy možné shrnout, že nejúčinnější na snížení příjmu potravy byly analogy, které měly navázanou mastnou kyselinu s více než 14 uhlíky, což pravděpodobně pomáhá jejich přechodu přes hematoencefalickou bariéru. Naopak analogy s kratšími mastnými kyselinami, případně bez navázané mastné kyseliny vykazovaly nižší účinnost v testech *in vivo*, proto zřejmě přes hematoencefalickou bariéru nepřechází. Z výsledků příjmu potravy vyplývá, že analogy palm-PrRP31, stear-PrRP31 a myr-PrRP20 jsou po periferním podání nejúčinnější, a proto vhodné k dalšímu studiu. Analog stear-PrRP31 byl hůře rozpustný ve vodě, navíc delší mastná kyselina nepřinesla lepší biologický účinek ve srovnání s analogem s navázanou kyselinou palmitovou, proto byly pro další testy vybrány pouze látky palm-PrRP31 a myr-PrRP20.

Na základě těchto výsledků bude dále zjišťováno, jestli skutečně studované analogy přes hematoencefalickou bariéru přechází, a to pomocí imunohistochemických testů studováním aktivace mozkových neuronů stanovením exprese proteinových produktů časných genů (c-Fos). Dále bude testován účinek těchto látek na myším DIO modelu, tj. u myší s obezitou indukovanou potravou (*diet-induced obesity*). Měl by být také více zkoumán mechanismus účinku těchto peptidů, aby bylo zjištěno, které další peptidy jsou v této regulaci zapojeny. Zároveň také bude testována možnost využití těchto látek k léčbě obezity.

## 6 ZÁVĚR

---

1) Pomocí *in vitro* experimentů bylo zjištěno, že analog prolaktin uvolňujícího peptidu Nle-PrRP31 a jeho modifikace s navázanými mastnými kyselinami jsou ve srovnání se samotnými PrRP31 a PrRP20 stále plně biologicky funkční. Při vazbě k hypofyzární buněčné linii RC-4B/C vykazují analogy s navázanou mastnou kyselinou vyšší afinitu k těmto buňkám, s  $K_i$  v řádu  $10^{-10}$  M, PrRP31 i PrRP20 mají  $K_i$  řádově  $10^{-9}$  M. Ve vazbě k receptoru GPR10 se výsledky nových analogů oproti vazbě PrRP31 a PrRP20 příliš neliší, kromě myr-PrRP31, u kterého byla zjištěna  $K_i$  řádu  $10^{-10}$  M, ostatní analogy mají  $K_i$  řádu  $10^{-9}$  M. U stanovení vazby analogů k receptoru NPFF<sub>2</sub> se již projevily odlišnost mezi analogy – Nle-PrRP31, oct-PrRP31, dec-PrRP31, dodec-PrRP31 a stear-PrRP31 měly  $K_i$  řádově  $10^{-8}$  M, myr-PrRP31, palm-PrRP31, dec-PrRP20, dodec-PrRP20 a myr-PrRP20 měly  $K_i$  řádově  $10^{-9}$  M. Byla také prokázána aktivita při spouštění signální dráhy MAPK/ERK1/2 a jeho koncentrační závislost u PrRP31, palm-PrRP31, PrRP20 a myr-PrRP20, kdy pro PrRP31 byla zjištěna  $EC_{50}$  v řádu  $10^{-10}$  M, u ostatních o řád vyšší, tj.  $10^{-9}$  M.

2) V *in vivo* experimentech bylo potvrzeno, že PrRP31 a PrRP20 nemají vliv na příjem potravy po periferním podání, stejně tak se v tomto směru ukázaly neúčinné analogy oct-PrRP31, dec-PrRP31, dodec-PrRP31, myr-PrRP31, oct-PrRP20, dec-PrRP20 a dodec-PrRP20. Naopak SC podání palm-PrRP31, stear-PrRP31 a myr-PrRP20 vedlo k významnému snížení příjmu potravy ve srovnání s kontrolními jedinci, jimž byl podán pouze fyziologický roztok, pravděpodobně v důsledku prostupu přes hematoencefalickou bariéru. V testech sledujících změny v chování pozorovaných myší se neprokázaly ani sedativní/excitační, ani algesické/analgetické účinky analogů. Stear-PrRP31 byl hůře rozpustný ve vodě, navíc delší navázaná mastná kyselina nepřinesla vylepšení biologického účinku oproti palm-PrRP31.

Látky palm-PrRP31 a myr-PrRP20 jsou tedy vhodnými kandidáty pro další studie a potenciálními antiobezitiky.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>  
datum přístupu: 19. 2. 2014
2. [http://www.who.int/gho/ncd/risk\\_factors/obesity\\_text/en/](http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/)  
datum přístupu: 19. 2. 2014
3. Yu JH, Kim MS: **Molecular mechanisms of appetite regulation.** *Diabetes Metab J* 2012, **36**(6):391-398.
4. Snow V, Barry P, Fitterman N, Qaseem A, Weiss K, Physicians CEASotACo: **Pharmacologic and surgical management of obesity in primary care: a clinical practice guideline from the American College of Physicians.** *Ann Intern Med* 2005, **142**(7):525-531.
5. Van Gaal LF, Wauters MA, De Leeuw IH: **The beneficial effects of modest weight loss on cardiovascular risk factors.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997, **21** Suppl 1:S5-9.
6. Li M, Cheung BM: **Pharmacotherapy for obesity.** *Br J Clin Pharmacol* 2009, **68**(6):804-810.
7. [http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data\[atc\\_group\]=A](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data[atc_group]=A)  
datum přístupu: 2. 4. 2014
8. Zhi J, Melia AT, Guerciolini R, Chung J, Kinberg J, Hauptman JB, Patel IH: **Retrospective population-based analysis of the dose-response (fecal fat excretion) relationship of orlistat in normal and obese volunteers.** *Clin Pharmacol Ther* 1994, **56**(1):82-85.
9. Weibel EK, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E, Lengsfeld H: **Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by Streptomyces toxytricini. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity.** *J Antibiot (Tokyo)* 1987, **40**(8):1081-1085.
10. Hermoso J, Pignol D, Penel S, Roth M, Chapus C, Fontecilla-Camps JC: **Neutron crystallographic evidence of lipase-colipase complex activation by a micelle.** *EMBO J* 1997, **16**(18):5531-5536.
11. Menendez JA, Vellon L, Lupu R: **Antitumoral actions of the anti-obesity drug orlistat (Xenical™) in breast cancer cells: Blockade of cell cycle progression, promotion of apoptotic cell death and PEA3-mediated transcriptional repression of Her2/neu (erbB-2) oncogene.** *Ann Oncol* 2005, **16**(8):1253-1267.
12. Tiss A, Lengsfeld H, Carrière F, Verger R: **Inhibition of human pancreatic lipase by tetrahydrolipstatin: Further kinetic studies showing its reversibility.** *J Mol Catal B Enzym* 2009, **58**(1-4):41-47.
13. Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JC: **CNS regulation of appetite.** *Neuropharmacology* 2012, **63**(1):3-17.
14. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fougère F, Ferré P, Birnbaum MJ *et al*: **AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus.** *Nature* 2004, **428**(6982):569-574.
15. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW: **Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons.** *Nat Neurosci* 1998, **1**(4):271-272.

16. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG: **Central nervous system control of food intake.** *Nature* 2000, **404**(6778):661-671.
17. Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S: **Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP.** *Peptides* 2006, **27**(5):1073-1086.
18. Dockray GJ: **The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour.** *Exp Physiol* 2004, **89**(3):229-235.
19. Bechtold DA, Luckman SM: **The role of RFamide peptides in feeding.** *J Endocrinol* 2007, **192**(1):3-15.
20. Röszer T, Bánfalvi G: **FMRFamide-related peptides: anti-opiate transmitters acting in apoptosis.** *Peptides* 2012, **34**(1):177-185.
21. Findeisen M, Rathmann D, Beck-Sickinger AG: **RFamide Peptides: Structure, Function, Mechanisms and Pharmaceutical Potential.** *Pharmaceuticals* 2011, **4**(9):1248 - 1280.
22. Engström M, Brandt A, Wurster S, Savola JM, Panula P: **Prolactin releasing peptide has high affinity and efficacy at neuropeptide FF2 receptors.** *J Pharmacol Exp Ther* 2003, **305**(3):825-832.
23. Maletínská L, Tichá A, Nagelová V, Spolcová A, Blechová M, Elbert T, Zelezná B: **Neuropeptide FF analog RF9 is not an antagonist of NPFF receptor and decreases food intake in mice after its central and peripheral administration.** *Brain Res* 2013.
24. Dodd GT, Luckman SM: **Physiological Roles of GPR10 and PrRP Signaling.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013, **4**:20.
25. Lamberts SW, Macleod RM: **Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph.** *Physiol Rev* 1990, **70**(2):279-318.
26. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H *et al*: **A prolactin-releasing peptide in the brain.** *Nature* 1998, **393**(6682):272-276.
27. Kataoka Y, Iijima N, Yano T, Kakiyama K, Hayashi S, Hinuma S, Honjo H, Tanaka M, Iwata Y: **Gonadal regulation of PrRP mRNA expression in the nucleus tractus solitarius and ventral and lateral reticular nuclei of the rat.** *Brain Res Mol Brain Res* 2001, **87**(1):42-47.
28. Takahashi K, Yoshinoya A, Arihara Z, Murakami O, Totsune K, Sone M, Sasano H, Shibahara S: **Regional distribution of immunoreactive prolactin-releasing peptide in the human brain.** *Peptides* 2000, **21**(10):1551-1555.
29. Onaka T, Takayanagi Y, Leng G: **Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide.** *Trends Endocrinol Metab* 2010, **21**(5):287-293.
30. Fujiwara K, Matsumoto H, Yada T, Inoue K: **Identification of the prolactin-releasing peptide-producing cell in the rat adrenal gland.** *Regul Pept* 2005, **126**(1-2):97-102.
31. Zhang X, Danila DC, Katai M, Swearingen B, Klibanski A: **Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor messenger ribonucleic acid in normal human pituitary and pituitary adenomas.** *J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**(12):4652-4655.
32. Lee Y, Yang SP, Soares MJ, Voogt JL: **Distribution of prolactin-releasing peptide mRNA in the rat brain.** *Brain Res Bull* 2000, **51**(2):171-176.

33. Tokita R, Nakata T, Katsumata H, Konishi S, Onodera H, Imaki J, Minami S: **Prolactin secretion in response to prolactin-releasing peptide and the expression of the prolactin-releasing peptide gene in the medulla oblongata are estrogen dependent in rats.** *Neurosci Lett* 1999, **276**(2):103-106.
34. Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P: **Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors.** *Genomics* 1995, **29**(2):335-344.
35. Lagerström MC, Fredriksson R, Bjarnadóttir TK, Fridmanis D, Holmquist T, Andersson J, Yan YL, Raudsepp T, Zoorob R, Kukkonen JP *et al*: **Origin of the prolactin-releasing hormone (PRLH) receptors: evidence of coevolution between PRLH and a redundant neuropeptide Y receptor during vertebrate evolution.** *Genomics* 2005, **85**(6):688-703.
36. Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Fujino M, Inoue K: **Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain.** *Endocrinology* 1999, **140**(5):2326-2333.
37. Roland BL, Sutton SW, Wilson SJ, Luo L, Pyati J, Huvar R, Erlander MG, Lovenberg TW: **Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery.** *Endocrinology* 1999, **140**(12):5736-5745.
38. Ibata Y, Iijima N, Kataoka Y, Kakihara K, Tanaka M, Hosoya M, Hinuma S: **Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain.** *Neurosci Res* 2000, **38**(3):223-230.
39. Fujii R, Fukusumi S, Hosoya M, Kawamata Y, Habata Y, Hinuma S, Sekiguchi M, Kitada C, Kurokawa T, Nishimura O *et al*: **Tissue distribution of prolactin-releasing peptide (PrRP) and its receptor.** *Regul Pept* 1999, **83**(1):1-10.
40. Nieminen ML, Brandt A, Pietilä P, Panula P: **Expression of mammalian RF-amide peptides neuropeptide FF (NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP) and the PrRP receptor in the peripheral tissues of the rat.** *Peptides* 2000, **21**(11):1695-1701.
41. Jarry H, Heuer H, Schomburg L, Bauer K: **Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release in vivo.** *Neuroendocrinology* 2000, **71**(4):262-267.
42. Lawrence CB, Celsi F, Brennand J, Luckman SM: **Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake.** *Nat Neurosci* 2000, **3**(7):645-646.
43. Lin SH, Leslie FM, Civelli O: **Neurochemical properties of the prolactin releasing peptide (PrRP) receptor expressing neurons: evidence for a role of PrRP as a regulator of stress and nociception.** *Brain Res* 2002, **952**(1):15-30.
44. Matsumoto H, Noguchi J, Horikoshi Y, Kawamata Y, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M: **Stimulation of prolactin release by prolactin-releasing peptide in rats.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **259**(2):321-324.
45. Matsumoto H, Maruyama M, Noguchi J, Horikoshi Y, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Inoue K *et al*: **Stimulation of corticotropin-releasing hormone-mediated adrenocorticotropin secretion by central administration of prolactin-releasing peptide in rats.** *Neurosci Lett* 2000, **285**(3):234-238.

46. Seal LJ, Small CJ, Dhillo WS, Kennedy AR, Ghatei MA, Bloom SR: **Prolactin-releasing peptide releases corticotropin-releasing hormone and increases plasma adrenocorticotropin via the paraventricular nucleus of the hypothalamus.** *Neuroendocrinology* 2002, **76**(2):70-78.
47. Matsumoto H, Murakami Y, Horikoshi Y, Noguchi J, Habata Y, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Fujino M: **Distribution and characterization of immunoreactive prolactin-releasing peptide (PrRP) in rat tissue and plasma.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **257**(2):264-268.
48. Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Noguchi J, Kitada C, Fujino M, Inoue K: **Prolactin-releasing peptide as a novel stress mediator in the central nervous system.** *Endocrinology* 2001, **142**(5):2032-2038.
49. Morales T, Sawchenko PE: **Brainstem prolactin-releasing peptide neurons are sensitive to stress and lactation.** *Neuroscience* 2003, **121**(3):771-778.
50. Spuch C, Diz-Chaves Y, Pérez-Tilve D, Alvarez-Crespo M, Mallo F: **Prolactin-releasing Peptide (PrRP) increases prolactin responses to TRH in vitro and in vivo.** *Endocrine* 2007, **31**(2):119-124.
51. Moriyama S, Ito T, Takahashi A, Amano M, Sower SA, Hirano T, Yamamori K, Kawauchi H: **A homolog of mammalian PRL-releasing peptide (fish arginyl-phenylalanyl-amide peptide) is a major hypothalamic peptide of PRL release in teleost fish.** *Endocrinology* 2002, **143**(6):2071-2079.
52. Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Noguchi J, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M, Higuchi T *et al*: **Central administration of prolactin-releasing peptide stimulates oxytocin release in rats.** *Neurosci Lett* 1999, **276**(3):193-196.
53. Yamashita M, Takayanagi Y, Yoshida M, Nishimori K, Kusama M, Onaka T: **Involvement of prolactin-releasing peptide in the activation of oxytocin neurones in response to food intake.** *J Neuroendocrinol* 2013, **25**(5):455-465.
54. Onaka T, Luckman SM, Antonijevic I, Palmer JR, Leng G: **Involvement of the noradrenergic afferents from the nucleus tractus solitarii to the supraoptic nucleus in oxytocin release after peripheral cholecystokinin octapeptide in the rat.** *Neuroscience* 1995, **66**(2):403-412.
55. Liposits Z, Phelix C, Paull WK: **Adrenergic innervation of corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A combined light and electron microscopic immunocytochemical study.** *Histochemistry* 1986, **84**(3):201-205.
56. Laurent P, Becker JA, Valverde O, Ledent C, de Kerchove d'Exaerde A, Schiffmann SN, Maldonado R, Vassart G, Parmentier M: **The prolactin-releasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor GPR10.** *Nat Neurosci* 2005, **8**(12):1735-1741.
57. Lawrence CB, Ellacott KL, Luckman SM: **PRL-releasing peptide reduces food intake and may mediate satiety signaling.** *Endocrinology* 2002, **143**(2):360-367.
58. Ellacott KL, Lawrence CB, Pritchard LE, Luckman SM: **Repeated administration of the anorectic factor prolactin-releasing peptide leads to tolerance to its effects on energy homeostasis.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003, **285**(5):R1005-1010.



59. Ellacott KL, Lawrence CB, Rothwell NJ, Luckman SM: **PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight.** *Endocrinology* 2002, **143**(2):368-374.
60. Bechtold DA, Luckman SM: **Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice.** *Endocrinology* 2006, **147**(10):4723-4729.
61. Onaka T: **Neural pathways controlling central and peripheral oxytocin release during stress.** *J Neuroendocrinol* 2004, **16**(4):308-312.
62. Olson BR, Drutarosky MD, Stricker EM, Verbalis JG: **Brain oxytocin receptor antagonism blunts the effects of anorexigenic treatments in rats: evidence for central oxytocin inhibition of food intake.** *Endocrinology* 1991, **129**(2):785-791.
63. Boyle RG, Downham R, Ganguly T, Humphries J, Smith J, Travers S: **Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide.** *J Pept Sci* 2005, **11**(3):161-165.
64. Maixnerová J, Špolcová A, Pýchová M, Blechová M, Elbert T, Rezáčová M, Zelezná B, Maletínská L: **Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor.** *Peptides* 2011, **32**(4):811-817.
65. Malavolta L, Cabral FR: **Peptides: important tools for the treatment of central nervous system disorders.** *Neuropeptides* 2011, **45**(5):309-316.
66. Havelund S, Plum A, Ribel U, Jonassen I, Vølund A, Markussen J, Kurtzhals P: **The mechanism of protraction of insulin detemir, a long-acting, acylated analog of human insulin.** *Pharm Res* 2004, **21**(8):1498-1504.
67. Gault VA, Kerr BD, Harriott P, Flatt PR: **Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with Type 2 diabetes and obesity.** *Clin Sci (Lond)* 2011, **121**(3):107-117.
68. Hurbain-Kosmath I, Berault A, Noel N, Polkowska J, Bohin A, Jutisz M, Leiter EH, Beamer WG, Bedigian HG, Davisson MT: **Gonadotropes in a novel rat pituitary tumor cell line, RC-4B/C. Establishment and partial characterization of the cell line.** *In Vitro Cell Dev Biol* 1990, **26**(5):431-440.
69. Tichá A: **Účinky analogů peptidu uvolňujícího prolaktin (PrRP) a neuropeptidu FF (NPFF) in vitro a in vivo.** Praha: Univerzita Karlova v Praze; 2012.
70. Kimura A, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Ikegami H, Hayakawa J, Hisamoto K, Morishige K, Hinuma S, Kurachi H *et al*: **Prolactin-releasing peptide activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase.** *J Biol Chem* 2000, **275**(5):3667-3674.
71. Maletínská L, Pýchová M, Holubová M, Blechová M, Demianová Z, Elbert T, Železná B: **Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency.** *J Pharmacol Exp Ther* 2012, **340**(3):781-786.
72. Motulsky H, Neubig R: **Analyzing radioligand binding data.** *Curr Protoc Neurosci* 2002, **Chapter 7**:Unit 7.5.
73. Cheng Y, Prusoff WH: **Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction.** *Biochem Pharmacol* 1973, **22**(23):3099-3108.

74. Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Pirník Z, Kiss A, Zelezná B: **Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice.** *BMC Neurosci* 2008, **9**:101.
75. Maletínská L, Lignon MF, Galas MC, Bernad N, Pírková J, Hlaváček J, Slaninová J, Martinez J: **Pharmacological characterization of new cholecystokinin analogues.** *Eur J Pharmacol* 1992, **222**(2-3):233-240.
76. Pirník Z, Bundziková J, Holubová M, Pýchová M, Fehrentz JA, Martinez J, Zelezná B, Maletínská L, Kiss A: **Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice.** *Neurochem Int* 2011, **59**(6):889-895.
77. Langmead CJ, Szekeres PG, Chambers JK, Ratcliffe SJ, Jones DN, Hirst WD, Price GW, Herdon HJ: **Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor.** *Br J Pharmacol* 2000, **131**(4):683-688.
78. Madsen K, Knudsen LB, Agersoe H, Nielsen PF, Thøgersen H, Wilken M, Johansen NL: **Structure-activity and protraction relationship of long-acting glucagon-like peptide-1 derivatives: importance of fatty acid length, polarity, and bulkiness.** *J Med Chem* 2007, **50**(24):6126-6132.
79. Lawrence CB, Liu YL, Stock MJ, Luckman SM: **Anorectic actions of prolactin-releasing peptide are mediated by corticotropin-releasing hormone receptors.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004, **286**(1):R101-107.
80. Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, Mera T, Fukusumi S, Hinuma S, Ueta Y, Yada T, Leng G, Onaka T: **Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents.** *J Clin Invest* 2008, **118**(12):4014-4024.
81. Gu W, Geddes BJ, Zhang C, Foley KP, Stricker-Krongrad A: **The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice.** *J Mol Neurosci* 2004, **22**(1-2):93-103.
82. Green BR, White KL, McDougale DR, Zhang L, Klein B, Scholl EA, Pruess TH, White HS, Bulaj G: **Introduction of lipidization-cationization motifs affords systemically bioavailable neuropeptide Y and neurotensin analogs with anticonvulsant activities.** *J Pept Sci* 2010, **16**(9):486-495.
83. Kerr BD, Irwin N, O'Harte FP, Bailey CJ, Flatt PR, Gault VA: **Fatty acid derivatised analogues of glucose-dependent insulinotropic polypeptide with improved antihyperglycaemic and insulinotropic properties.** *Biochem Pharmacol* 2009, **78**(8):1008-1016.
84. Bellmann-Sickert K, Elling CE, Madsen AN, Little PB, Lundgren K, Gerlach LO, Bergmann R, Holst B, Schwartz TW, Beck-Sickinger AG: **Long-acting lipidated analogue of human pancreatic polypeptide is slowly released into circulation.** *J Med Chem* 2011, **54**(8):2658-2667.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

| Jméno a příjmení<br>s adresou | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|-------------------------------|----------|-----------------|----------|
|                               |          |                 |          |